

**Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von aliphatisch-aromatischen  
Copolyestern sowie Isolierung und Charakterisierung eines  
polyesterspaltenden Enzyms**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
genehmigte  
DISSERTATION

von  
Ilona Kleeberg  
aus Hamburg

1. Referent: Prof. Dr. W.-D. Deckwer

2. Referent: Prof. Dr. R. Näveke

eingereicht am: 4. Februar 1999

mündliche Prüfung (Disputation) am: 20. Mai 1999

Druckjahr 2000

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Kleeberg, I., Hetz, C., Kroppenstedt R.M., Müller R.-J. und Deckwer, W.-D. (1998). Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates. Appl. Environ. Microbiol. 64 (5), 1731-1735.

### **Tagungsbeiträge**

Kleeberg, I., Müller, R.-J., Kroppenstedt, R.M. und Deckwer, W.-D. (1997). Thermophilic actinomycetes - useful organisms for accelerated biodegradability-testing of polymers? (Poster) International Conference on Advanced Materials (E-MRS'97), Symposium H: Biodegradable Polymers & Macromolecules, Strasbourg, 16. bis 19. Juni 1997.

Kleeberg, I. und Müller, R.-J. (1998). Isolation of aliphatic-aromatic copolyester degrading thermophilic microorganisms and characterization of their enzyme system. (Vortrag) 5th International Scientific Workshop on Biodegradable Plastics and Polymers, Stockholm, 9. bis 13. Juni 1998.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. W.-D. Deckwer, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig, danke ich für die Themenstellung, seine Unterstützung und sein großes Interesse an der Entwicklung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Näveke, Institut für Mikrobiologie an der Technischen Universität Braunschweig, danke ich für die Übernahme des Coreferates.

Die vorliegende Arbeit wurde an der GBF in der Abteilung Bioverfahrenstechnik angefertigt. Bei allen Mitarbeitern, insbesondere bei denen der Arbeitsgruppen Umweltbiotechnologie und Prozeßentwicklung, bedanke ich mich herzlich für die große Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Mein ganz besonderer Dank gilt

Herrn Dr. R. J. Müller für die zahlreichen konstruktiven und motivierenden Diskussionen und sein lebhaftes Interesse an dieser Arbeit.

Frau C. Hetz für ihre unermüdliche Einsatzbereitschaft und viele hilfreiche Anregungen sowie Frau H. Schrader für ihre guten technischen Ratschläge.

Frau Dr. D. Petsch für ihre gute und geduldige Einarbeitung in die Praktiken der FPLC.

Bei Herrn Dr. R. M. Kroppenstedt, Frau B. Grün und Frau G. Pötter-Reinemann von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig bedanke ich mich herzlich für ihre stete Bereitschaft, mich bei der Isolierung, Kultivierung und Identifizierung der Actinomyceten mit Rat und Tat zu unterstützen sowie für die Durchführung des aufwendigen Screenings der Actinomyceten-Stammsammlung.

Frau S. Springer, die im Rahmen ihrer Studienarbeit respirometrische Untersuchungen durchführte, und Frau Dr. M. Gouda von der Faculty of Science an der Alexandria University, Ägypten, die im Rahmen eines zweimonatigen Stipendiums an der GBF Titrationsversuche durchführte, danke ich für ihre engagierte Mitarbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. H. Lünsdorf und Dr. M. Rohde (beide GBF, Braunschweig) für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Herrn Dr. M. Kieß (GBF, Braunschweig) für die Analyse der Aminosäuresequenz der BTA-Hydrolase.

Herrn Dr. U. Witt und Herrn Dr. M. Yamamoto von der BASF AG in Ludwigshafen danke ich besonders für die freundliche Bereitstellung der wäßrigen Copolyester-Dispersion.

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Aufgabenstellung.....	3
3 Grundlagen.....	4
3.1 Biologisch abbaubare Polymere .....	4
3.1.1 Stand der Technik .....	4
3.1.2 „Bioabbaubarkeit“: Definitionen und Testverfahren .....	5
3.1.3 Aliphatisch-aromatische Copolyester .....	7
3.2 Abbau von Polymeren unter natürlichen Bedingungen.....	8
3.2.1 Überblick .....	8
3.2.2 Umwelt .....	9
3.2.3 Einfluß der Polymereigenschaften auf die Bioabbaubarkeit.....	10
3.2.4 Mikrobieller Abbau von makromolekularen Strukturen .....	11
3.3 Isolierung von polymerabbauenden Reinstämmen .....	13
3.4 Polyesterspaltende Enzyme.....	14
3.4.1 Klassifikation .....	14
3.4.1.1 Allgemeines .....	14
3.4.1.2 Carboxylische Esterhydrolasen.....	15
3.4.1.3 Serin-Endopeptidasen .....	15
3.4.2 Definitionen .....	16
3.4.2.1 Extrazelluläre Enzyme .....	16
3.4.2.2 Exo- und Endoenzyme.....	16
3.4.3 Enzymreinigung.....	17
3.4.3.1 Auswahl der Methoden .....	17
3.4.3.2 Ionenaustauschchromatographie (IEXC) .....	17
3.4.3.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	18
4 Untersuchungen und Ergebnisse .....	19
4.1 Isolierung polyesterspaltender Mikroorganismen .....	19
4.1.1 Entwicklung des Isolierungsverfahrens .....	19
4.1.2 Ergebnisse der Isolierung.....	22
4.1.3 Identifizierung ausgesuchter Actinomyceten-Reinstämme .....	25
4.1.4 Bakteriophageninfektionen der Isolate .....	27
4.1.4.1 Verdacht und Nachweis der Bakteriophagen von Isolat K13g .....	27
4.1.4.2 Lösung des Bakteriophagenproblems .....	28
4.1.5 Screening der Actinomyceten-Stammsammlung der DSMZ auf BTA-Hydrolyse .....	30
4.2 Charakterisierung des Abbauverhaltens ausgesuchter Stämme .....	33
4.2.1 Vorbemerkung.....	33
4.2.2 Polyesterspaltung auf Agarplatten .....	33
4.2.2.1 Aufnahme von Hydrolysekurven mit <i>Thermomonospora fusca</i> K13g .....	33

4.2.2.2 Gegenüberstellung von Kompostsimulierung und Hydrolysetest auf Agarplatten .....	36
4.2.2.3 Spaltung verschiedener Polyesterstrukturen durch <i>Thermomonospora fusca</i> K7a-3 und K13g.....	37
4.2.2.4 Einfluß der Temperatur auf die BTA-Hydrolyse .....	39
4.2.3 Polyesterspaltung in Flüssigkultur .....	40
4.2.3.1 Optimierung des Beimpfungsmodus.....	40
4.2.3.2 Optimierung des Mineralsalzmediums MSV.....	43
4.2.3.3 Lokalisierung des BTA-hydrolysierenden Enzyms .....	47
4.2.3.4 Regulation der Enzymproduktion .....	48
4.2.3.5 Aufnahme von Hydrolysekurven in Flüssigkultur .....	52
4.2.4 Untersuchungen zur Metabolisierung der Spaltprodukte des BTA-Copolyesters .....	55
4.2.4.1 Vorbemerkungen .....	55
4.2.4.2 Respirometrische Tests auf Agarplatten .....	55
4.2.4.3 Respirometrische Tests in Flüssigkultur.....	56
4.3 Isolierung und Charakterisierung des BTA-hydrolysierenden Enzyms.....	59
4.3.1 Methoden zum Nachweis BTA-hydrolysierender Enzyme .....	59
4.3.1.1 Vorbemerkungen .....	59
4.3.1.2 Gewichtsverlust von Polymerfilmen .....	59
4.3.1.3 UV-Absorptionstest .....	61
4.3.1.4 Titration.....	61
4.3.1.5 Clear Zone Test .....	62
4.3.2 Haltbarkeit der Enzymlösungen.....	64
4.3.3 Vorversuche für die Reinigung BTA-hydrolysierender Enzyme .....	64
4.3.3.1 Konzentrierung der Kulturüberstände .....	64
4.3.3.2 Ionenaustauschchromatographie (IEXC) .....	65
4.3.3.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	71
4.3.4 Ergebnis der Enzymreinigung .....	77
4.3.4.1 Beschreibung der Reinigung der BTA-Hydrolase .....	77
4.3.4.2 Aktivitätsnachweis des isolierten Proteins.....	79
4.3.5 Charakterisierung der gereinigten BTA-Hydrolase .....	80
4.3.5.1 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE .....	80
4.3.5.2 Bestimmung des isoelektrischen Punktes der BTA-Hydrolase .....	81
4.3.5.3 Aminosäurezusammensetzung und -sequenz der BTA-Hydrolase.....	83
4.3.5.4 Vergleich der BTA-Enzymaktivität des gereinigten Enzyms mit der einer <i>Pseudomonas-sp.</i> -Lipase .....	85
4.3.5.5 Temperaturoptimum und -stabilität .....	86
4.3.5.6 pH-Optimum des gereinigten BTA-hydrolysierenden Enzyms .....	88
4.3.5.7 Substratspektrum der BTA-Hydrolase bezüglich verschiedener Polyesterstrukturen .....	89
4.3.5.8 Substratspektrum der BTA-Hydrolase bezüglich verschiedener Triglyceride .....	90

---

5 Diskussion .....	92
5.1 BTA-hydrolysierende Mikroorganismen .....	92
5.1.1 Vorkommen und Verbreitung.....	92
5.1.2 Esterbindungen in natürlichen Substraten der Actinomyceten .....	93
5.1.2.1 Vorbemerkung .....	93
5.1.2.2 Lignocellulosen .....	94
5.1.2.3 Cutin und Suberin .....	96
5.1.2.4 Polyhydroxybuttersäure (P(3HB)) .....	97
5.2 Untersuchungen zur Regulation der Synthese des polyesterspaltenden Enzyms .....	98
5.3 Untersuchungen zur Metabolisierung des BTA-Copolyesters .....	100
5.4 Isolierung und Charakterisierung der BTA-Hydrolase .....	101
6 Zusammenfassung.....	109
7 Material und Methoden .....	112
7.1 Eingesetzte Polymere und ihre Verarbeitung.....	112
7.1.1 Materialien .....	112
7.1.2 Herstellung von Polymerfilmen durch Schmelzpressen.....	112
7.1.3 Sterilisation der Polymerfilme .....	113
7.1.3.1 UV-Licht (WALLHÄUSSER 1984) .....	113
7.1.3.2 Wasserstoffperoxidlösung (WALLHÄUSER 1984) .....	113
7.1.3.3 Autoklavieren von PHB-Filmen .....	114
7.2 Mikrobiologische Untersuchungen .....	114
7.2.1 Mikroorganismen .....	114
7.2.2 Medien.....	114
7.2.2.1 Allgemeines .....	114
7.2.2.2 Medien für das Screening und für die Hydrolysetests.....	115
7.2.2.3 Medien für die Isolierung und Stammhaltung.....	116
7.2.2.4 Spurenelement- und Vitaminlösungen .....	117
7.2.3 Isolierung polyesterspaltender Reinstämme.....	118
7.2.3.1 Herstellung der Inokula .....	118
7.2.3.2 Anreicherung und Isolierung der Reinstämme .....	119
7.2.3.3 Hydrolysetest mittels Agarplattenmethode.....	120
7.2.4 Kultivierung der Actinomyceten in Flüssigmedien .....	120
7.2.5 Gefriertrocknung.....	121
7.2.6 Stammhaltung .....	121
7.2.6.1 Sporensuspensionen .....	121
7.2.6.2 Glycerinkonserven .....	121
7.2.6.3 Stammhinterlegung an der DSMZ.....	122
7.2.7 Lebendkeimzahl von Sporen- und Bakteriensuspensionen.....	122
7.2.8 Identifizierung ausgesuchter Actinomyceten-Stämme.....	122
7.2.8.1 Fettsäuren.....	122
7.2.8.2 Zucker.....	123

---

7.2.8.3 Phospholipide .....	124
7.2.8.4 Menachinone .....	126
7.2.8.5 16S rDNA-Partialsequenzanalyse.....	126
7.2.9 Mikroskopische Untersuchungen.....	127
7.2.9.1 Durchlichtmikroskopie .....	127
7.2.9.2 Auflichtmikroskopie .....	127
7.2.9.3 Rasterelektronenmikroskopie.....	127
7.2.9.4 Transmissionselektronenmikroskopie .....	128
7.3 Nachweis der Metabolisierung von Bestandteilen des BTA-Copolyesters .....	128
7.3.1 Titrimetrische Bestimmung der Kohlenstoffdioxidentwicklung .....	128
7.3.1.1 Prinzip und Versuchsaufbau .....	128
7.3.1.2 Durchführung .....	129
7.3.2 Bestimmung der Kohlenstoffdioxidentwicklung mittels IR-Gasanalysator .....	130
7.3.2.1 Prinzip und Versuchsaufbau .....	130
7.3.2.2 Durchführung .....	131
7.4 Biochemische Untersuchungen .....	132
7.4.1 Herstellung der Puffer .....	132
7.4.2 Zellaufschluß .....	133
7.4.2.1 Zerstörung des Actinomycetenmyzels durch Ultraschall.....	133
7.4.2.2 Zellaufschluß für die Bestimmung intrazellulärer Proteine .....	133
7.4.3 Bestimmung des Proteingehaltes .....	133
7.4.4 Enzymtests .....	134
7.4.4.1 Gewichtsverlust von Polymerfilmen .....	134
7.4.4.2 UV-Absorptionstest .....	134
7.4.4.3 Titration.....	135
7.4.4.4 Clear Zone Test (CZT).....	137
7.4.5 Enzymgewinnung .....	138
7.4.5.1 Kultur .....	138
7.4.5.2 Ammoniumsulfat-Fällung .....	138
7.4.5.3 Ultrafiltration.....	139
7.4.5.4 Dialyse .....	139
7.4.5.5 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) .....	139
7.4.5.6 Test Tube Method.....	141
7.4.6 Elektrophoretische Nachweismethoden .....	142
7.4.6.1 Analytische SDS-Gelelektrophorese.....	142
7.4.6.2 Isoelektrische Fokussierung.....	142
7.4.6.3 Präparative Gelelektrophoresen .....	142
7.4.6.4 Proteintransfer durch „Western-Blot“ .....	144
7.4.6.5 Coomassie-Blau-Färbung .....	145
7.4.7 Untersuchung der Aminosäuresequenz .....	145
7.5 Chemikalien und Geräte .....	146



---

8 Literatur .....	148
9 Anhang .....	159

**Abkürzungen und Symbole**

Ac-Ka	Actinomyceten-Kompostanreicherung
Ala (A)	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg (R)	Arginin
AS	Aminosäure
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Asparaginsäure
Asx (B)	Asparagin oder Asparaginsäure
ASTM	American Society for Testing and Materials
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Bicinchonic acid)
BF	Biofilm
BHI	Brain-Heart-Infusion-Medium
BSA	Bovine Serum Albumin
BTA	Copolyester aus Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure
BW	Blindwert
CEN	Comité Européenne de Normalisation
Cys (C)	Cystein
CZT	Clear Zone Test
GPC	Gelpermeationschromatographie
Da	Dalton
DIN	Deutsches Institut für Normung
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ES	Esterspaltung
FF	Fast Flow
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
GC	Gaschromatographie
GLA	Gesamt-Lipaseaktivität
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutaminsäure
Glx	Glutamin oder Glutaminsäure
Gly (G)	Glycin
GP	Gesamtprotein
GV	Gesamtvolumen
GYM <sup>+</sup>	Streptomyces-Medium
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
His (H)	Histidin
ICI	Imperial Chemical Industries
IEF	Isoelektrische Fokussierung

---

IEXC	Ionenaustauschchromatographie
Ile (I)	Isoleucin
IR	Infrarot
ISO	International Standardization Organisation
KBE	Kolonie bildende Einheiten
KE	Komposteluat
KEA	Kompostextrakt-Medium
KEA <sup>++</sup>	„Fetter“ Kompostextrakt Agar
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lysin
Met (M)	Methionin
MO	Mikroorganismen
M <sub>w</sub>	Gewichtsmittel des Molekulargewichtes der Polymere
MW	molecular weight
MWCO	molecular weight cut off
m <sub>a</sub>	Anfangsgewicht von Polymerfilmen
n	Anzahl
n.b.	nicht bestimmt
NB	Nutrient Broth
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHB	Polyhydroxybuttersäure
P(3HB)	Poly(3-hydroxybuttersäure)
Phe (F)	Phenylalanin
Pro (P)	Prolin
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q	Glutamin (Gln)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RG	Reagenzglas
Sb.	Siedebereich
SCK	Stärke-Casein-KNO <sub>3</sub> -Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser (S)	Serin
SLP	spezifische Lipaseaktivität
SOP	Standard Operating Procedure
SPxy	Saturated Polyester (aus einer Diolkomponente mit x- und einer Dicarbonsäurekomponente aus y-Kohlenstoffatomen)
StIM	Standard-I-Malzextrakt-Medium
StIIsoy	Standard-II-Soy-Medium
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Thr (T)	Threonin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Trp (W)	Tryptophan
TSB	Tryptic Soy Broth
Tyr (Y)	Tyrosin
UF	Ultrafiltration
Upm	Umdrehungen pro Minute
UT	Ultraturrax
Val (V)	Valin
VK	Vorkultur
X	Platzhalter für eine beliebige Aminosäure

## 1 Einleitung

Forschung und Entwicklung der Kunststoffindustrie brachten gut formbare, leichte und dennoch stabile und sehr haltbare Materialien hervor. Gerade die Langzeitstabilität der Kunststoffe ist für bestimmte Anwendungen, wie z.B. bei Konstruktionen im Bau oder bei Rohrleitungen, eine Grundvoraussetzung für ihren gefahrlosen Einsatz. Ein ganz anderes Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Anwendungsbereiche von Kunststoffen mit einer kurzen Nutzungsdauer. Verpackungsmaterialien gelangen z.B. nach Gebrauch sehr schnell in den Abfallstrom und stellen den größten Anteil der Kunststoffabfälle dar (WITT et al. 1997). Vor dem Hintergrund zunehmender Probleme der Müllentsorgung (Verknappung des Deponieraumes, Probleme des Kunststoffrecyclings, Dioxin-Emissionen bei der PVC-Verbrennung etc.) wurde seit Ende der 80er Jahre die Entwicklung biologisch abbaubarer Kunststoffe intensiviert. Mit der neuen Eigenschaft der biologischen Abbaubarkeit schienen sich für derartige Kunststoffe alternative ökologische Entsorgungswege z.B. über die Kompostierung zu eröffnen. Die Eingliederung dieser Entsorgungswege in vorhandene Strukturen der Abfallwirtschaft ist bis heute noch nicht abgeschlossen.

In Deutschland wird die Verwertung von Abfällen seit Oktober 1996 durch das Kreislaufwirtschaftsgesetz mit der Zielhierarchie Müllvermeidung, Müllverwertung (stoffliches Recycling oder Energie-/Wärmegewinnung durch Verbrennung) und Müllbeseitigung (Deponierung) geregelt. Nur nicht-verwertbare Abfälle dürfen beseitigt und damit deponiert werden. Die Technische Anleitung Siedlungsabfall (TASI) fordert, daß ab dem Jahr 2005 nur noch Abfälle mit maximal 5% organischen Anteilen (gemessen als Glühverlust) auf Deponien abgelagert werden dürfen. Dies hat zur Folge, daß weder konventionelle noch biologisch abbaubare Kunststoffe ab diesem Zeitpunkt ohne vorherige thermische Vorbehandlung deponiert werden dürfen (WITT et al. 1997).

Da derzeit keine gesetzlichen Vorgaben für die zwingende Verwendung von bioabbaubaren Kunststoffen in bestimmten Bereichen in Deutschland existieren und die Produktion herkömmlicher Kunststoffe im allgemeinen preiswerter ist, muß die Eigenschaft der Bioabbaubarkeit dem Nutzer Vorteile gegenüber konventionellen Materialien bieten. So können biologisch abbaubare Kunststoffe in Bereichen, in denen das Recycling mit einem hohen Energie- und Kosteneinsatz für Sammlung, Transport, Reinigung und Aufarbeitung verbunden ist, eine ökologisch sinnvolle Alternative zu herkömmlichen Kunststoffen darstellen (MILLER 1992). Der vordergründige Preisvorteil konventioneller Kunststoffe kann auf diese Weise amortisiert werden. Zu denken ist hier insbesondere an die Bereiche Haushalt (Müllbeutel für die Biotonne), Lebensmittel (Einweggeschirr/Monochargen), Gartenbau (Pflanztöpfe, Blumenbinder), und Landwirtschaft (Folien zur Ernteverfrühung, Pellets für

„Controlled Release“ von Dünge- oder Pflanzenschutzmitteln, Matten für Bodenbefestigungen).

Im Bereich biologisch abbaubarer Kunststoffe stellen Polyester, neben Stärke und Cellulose, die mengenmäßig wichtigste Stoffklasse dar (WITT et al. 1997). Wie auch andere synthetische Polymere, die einem Bioabbau unterliegen, enthalten sie Heteroatome in der Polymerkette, die einem mikrobiellen Angriff zugänglich sind. Rein aliphatische Polyester (z.B. Polycaprolacton) gelten als leicht bioabbaubar, verfügen jedoch nur über mäßige Materialeigenschaften, wie z.B. niedrige Schmelzpunkte. Dagegen zeigen aromatische Polyester (z.B. Polyethylenterephthalat) bei guten Materialeigenschaften keinen meßbaren biologischen Abbau (HUANG 1989, KAWAI 1995).

Durch geeignete Kombination von aromatischen und aliphatischen Komponenten gelang es Mitte der 90er Jahre unter Einsatz konventioneller Polykondensationstechniken statistische Copolyester herzustellen, die gleichzeitig biologische Abbaubarkeit und gute mechanische Eigenschaften aufweisen (WITT et al. 1994). Speziell Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure, die 30 bis 60% Terephthalsäure in der Säurekomponente enthalten, stellen einen optimalen Kompromiß zwischen biologischer Abbaubarkeit (Abbau innerhalb von 8 - 12 Wochen in Erde und Kompost) und guten Materialeigenschaften (flexible Filme, Schmelzpunkte von 90 - 140°C) dar (WITT et al. 1995). Derartigen Copolyestern ist in jüngster Vergangenheit großes kommerzielles Interesse zugekommen. Gründe hierfür sind u.a. die ausreichende Verfügbarkeit der Rohstoffe (petrochemische Basis), ein relativ niedriger Preis (ca. 5 bis 7 DM/kg) sowie hervorragende Material- und Verarbeitungseigenschaften, die denen des Polyethylens ähneln. Derartige Copolyester werden zur Zeit von der BASF AG (Ludwigshafen) unter dem Namen Ecoflex® mit einer Kapazität von mehreren tausend Tonnen pro Jahr produziert. Ähnliche Entwicklungen werden von den Firmen Eastman (Kingsport, USA) und Hüls AG (Marl) vorangetrieben.

## 2 Aufgabenstellung

Der gesicherte Nachweis der vollständigen biologischen Abbaubarkeit ist eine grundlegende Voraussetzung für die umweltsichere Anwendung von bioabbaubaren Kunststoffen. So wurden die aliphatisch-aromatischen Copolyester bereits mit einer Reihe von z.T. genormten Testverfahren auf ihre Abbaubarkeit hin untersucht. In der Regel werden bei diesen Untersuchungsmethoden nicht näher definierte mikrobielle Mischpopulationen verwendet und die Testumgebungen sind teilweise sehr komplex. Dies garantiert zwar eine weitgehende „Universalität“ der Testverfahren für unterschiedliche Kunststoffe, bedingt aber Begrenzungen hinsichtlich der Genauigkeit der Messungen sowie der Analyse von Abbauprodukten.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, für die technisch relevante Gruppe der aliphatisch-aromatischen Copolyester spezielle polyesterspaltende Mikroorganismen aus Kompostmaterial zu isolieren. Neben Aussagen über die Verbreitung der polyesterspaltenden Organismen sollten ausgewählte Stämme charakterisiert und die Isolate in Bezug auf die Verwendung in optimierten und definierten Abbautests untersucht werden.

Im Hinblick auf die Klärung der Mechanismen des Copolyesterabbaus war es weiterhin von großem Interesse gegebenenfalls die für die Depolymerisierung verantwortlichen Enzyme zu isolieren und möglichst umfassend zu charakterisieren.

## 3 Grundlagen

### 3.1 Biologisch abbaubare Polymere

#### 3.1.1 Stand der Technik

In den letzten fünf Jahren ist die Anzahl der mit der Zielsetzung einer kommerziellen Nutzung entwickelten biologisch abbaubaren Werkstoffe drastisch angestiegen. Die Produkte lassen sich grob in vier Gruppen einteilen: (1) natürliche Polymere, (2) chemisch modifizierte natürliche Polymere, (3) synthetische Polymere aus natürlichen Bausteinen und (4) synthetische Polymere aus petrochemischen Bausteinen. In Tabelle 3.1 werden Vor- und Nachteile sowie Beispiele zu diesen Gruppen vorgestellt.

Tabelle 3.1 Einige Beispiele biologisch abbaubarer Werkstoffe.

Gruppe	Vorteile	Nachteile	Beispiel
1. natürliche Polymere	nachwachsende Rohstoffe, hohe Molmassen, teilweise preiswert	für die Verarbeitung ungünstige Materialeigenschaften, schwer zu variieren, schwer zu reproduzieren	Stärke, Cellulose, Polyhydroxybutter-säure
2. chemisch modifizierte natürliche Polymere	partiell nachwachsende Rohstoffe, Materialeigenschaften relativ variabel	Struktur schwer kontrollierbar, teilweise noch relativ teuer	Celluloseacetat, Stärkeacetat
3. synthetische Polymere aus natürlichen Bausteinen	nachwachsende Rohstoffe, kontrollierbare Strukturen, reproduzierbar und variabel	zur Zeit noch relativ teuer	Polymilchsäure
4. synthetische Polymere aus petrochemischen Bausteinen	sehr gute Materialeigenschaften, preiswert, variabel, reproduzierbar, schnell verfügbar	keine nachwachsenden Rohstoffe	aliphatische Polyester, Polyesteramide, Polyurethane, aliphatisch-aromatische Copolyester

Eine aktuelle Marktübersicht gibt die Studie des Franz-Patat-Zentrums, Braunschweig (WITT et al. 1997). Weitere Studien zu diesem Thema existieren vom Fraunhofer-Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung über den Einsatz biologisch abbaubarer Kunststoffe im Verpackungsbereich (WESTERHAUSEN et al. 1990) und vom Institut für Kunststofftechnologie der Universität Stuttgart in Zusammenarbeit mit dem Entwicklungszentrum der BUCK-Werke (FRITZ et al. 1994).



### 3.1.2 „Bioabbaubarkeit“: Definitionen und Testverfahren

Abzugrenzen gegen den Begriff „Bioabbau“ ist der Begriff der „Biokorrosion“, worunter die Veränderung der Materialeigenschaften, einschließlich optischer Kriterien wie z.B. Verfärbungen, verstanden wird. Da in vielen klassischen Anwendungsgebieten polymerer Werkstoffe ein mikrobieller Befall oder Bewuchs verhindert werden soll, wurden zunächst nur Methoden entwickelt und angewandt, die die Resistenz derartiger Werkstoffe gegen einen solchen Befall nachweisen (z.B. DIN 53739). Diese Methoden sagen aber meist wenig über die tatsächliche Abbaubarkeit, verstanden als vollständige Metabolisierung der polymeren Stoffe, aus (AUGUSTA et al. 1992).

Die Entwicklung einheitlicher Beurteilungskriterien und entsprechender Meßmethoden zur Feststellung der Bioabbaubarkeit wurden dringend notwendig, um die Umweltverträglichkeit der Kunststoffe sicherstellen zu können (AUGUSTA et al. 1992). Seit dem Ende der 80er Jahre bemühen sich verschiedene Organisationen (Bild 3.1) eine geeignete Basis zur Beurteilung bioabbaubarer polymerer Werkstoffe zu erarbeiten. Nach COHORS-FRESENBORG (1994) erfolgen dabei Untersuchungen zur Bewertung der biologischen Abbaubarkeit meist in einer dreistufigen Testhierarchie:

#### 1. Bestimmung des Bioabbaupotentials eines Stoffes

Screening-Tests wie z.B. der CO<sub>2</sub>-Entwicklungstest (OECD-Guideline 301B) werden im Labor unter definierten Bedingungen in synthetischen Umgebungen (definierte Nährmedien) durchgeführt.

#### 2. Untersuchung des biologischen Abbaus unter realitätsnahen Bedingungen

Im Labor durchgeführte Simulationstests, die Bedingungen z.B. während eines Kompostierungsprozesses (DIN V 54900-2, Abschnitt 8) simulieren und eine Bilanzierung des Abbauverhaltens eines Stoffes ermöglichen.

#### 3. Untersuchung des biologischen Abbaus unter Umweltbedingungen

Freilandversuche in Wasser, Boden oder Kompost (komplexe Systeme, variierende Umgebungsbedingungen) sollen den höheren Ansprüchen an die Darstellung des tatsächlichen Umweltverhaltens eines Stoffes genügen (z.B. DIN V 54900-3, Abschnitt 7).

Übersichten über wichtige international anerkannte Testmethoden und Normverfahren werden in PAGGA (1994) und WITT et al. (1997) gegeben.

International Standardization Organisation (ISO) TC 61 SC5 WG 22 „Biodegradability of Plastics“  Comité Européenne de Normalisation (CEN) TC 261 SC4 WG2 „Degradability of Packaging Materials“  American Society for Testing and Materials (ASTM) ASTM D-20.96.01  Deutsches Institut für Normung (DIN) FNK 103.3 „Bioabbaubare Kunststoffe“  Biodegradable Plastics Society, Japan
---

Bild 3.1

Verschiedene Organisationen und von ihnen bearbeitete Normverfahren (nach WITT et al. 1997).

Die vorliegende Arbeit orientiert sich an den Definitionen der Begriffe „Bioabbau“ und „Bioabbaubarkeit“ wie sie in der DIN 54900-2 (1998) zur „Prüfung der Kompostierbarkeit von Kunststoffen“ gegeben werden:

- Bioabbau:** Ein durch biologische Aktivität verursachter Vorgang, der unter Veränderung der chemischen Struktur eines Materials zu natürlich vorkommenden Stoffwechselprodukten führt.
- Bioabbaubarkeit:** Ein Kunststoff ist bioabbaubar, wenn alle organischen Bestandteile einem vollständigen biologischen Abbau unterliegen. Die Umgebungsbedingungen und die Geschwindigkeit des Bioabbaus werden in geeigneten Prüfverfahren bestimmt.

Weitere wichtige Begriffe, die ursprünglich aus dem Bereich von Abbauprüfungen niedermolekularer, meist wasserlöslicher Substanzen stammen und inzwischen auch im Zusammenhang mit der Prüfung der Bioabbaubarkeit von Kunststoffen in der Literatur verwendet werden, sind:

**leichte Abbaubarkeit (ready biodegradability):**

Dieser Begriff ist im Rahmen der Stoffbewertung durch die OECD-Definition eindeutig belegt. Ein Stoff darf nur dann als leicht biologisch abbaubar bezeichnet werden, wenn in einer vorgegebenen Methode ein bestimmter Grenzwert innerhalb von zehn Tagen (Zehn-Tage-Fenster) erreicht wird (PAGGA 1994). Substanzen, die diesem Anspruch genügen, werden in der Umwelt als schnell abbaubar angesehen.

**prinzipielle Abbaubarkeit (inherent biodegradability):**

Ein Abbau ist unter optimalen Bedingungen grundsätzlich möglich, muß aber unter normalen Umständen nicht eintreten (WESTERHAUSEN et al. 1990).

**Primärabbau:**

Verlust der Identität eines Stoffes durch erste biochemische Transformation, zum Teil mit Bildung von stabilen Kataboliten (AUGUSTA et al. 1992, PAGGA 1994).

**Vollständiger Abbau (Endabbau):**

Der vollständige Abbau einer Substanz endet in der Mineralisation (aerob:  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$ , anaerob:  $\text{CH}_4$  und  $\text{CO}_2$ ) und in der Assimilation (Einbau der Substanz in die mikrobielle Biomasse) (AUGUSTA et al. 1992, PALMISANO und PETTIGREW 1992).

**3.1.3 Aliphatisch-aromatische Copolyester**

Copolymere setzen sich im Gegensatz zu den Homopolymeren aus unterschiedlichen Monomeren zusammen. Im Falle von Polyestern bedeutet dies, daß mindestens zwei Diol oder zwei Dicarbonsäuren vorhanden sind. Jeweils ein Diol und eine Dicarbonsäure bilden in Polyestern eine Repetiereinheit. Die Reihenfolge dieser Repetiereinheiten kann in Copolyestern alternierend, statistisch oder blockartig sein (Bild 3.2).

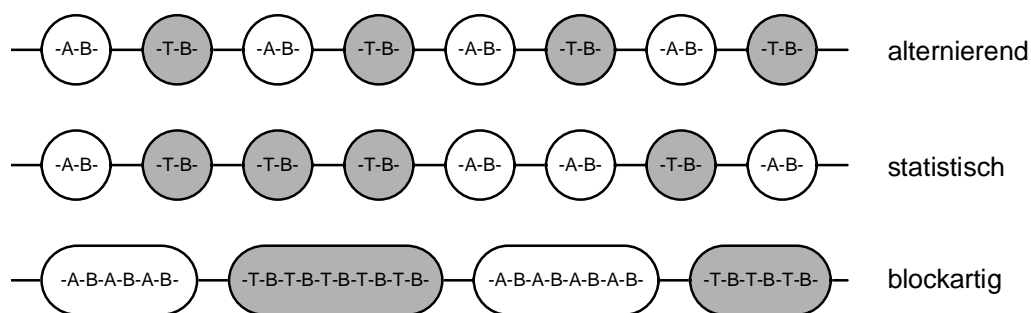


Bild 3.2 Primärstrukturen der Copolymere und ihre Unterteilung.

Die Strukturformel des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Copolyesters „BTA“ wird in Bild 3.3 dargestellt. Es handelt sich um einen statistischen Copolyester bestehend aus den Komponenten 1,4-Butandiol, Terephthalsäure (aromatische Dicarbonsäure) und Adipinsäure (aliphatische Dicarbonsäure).

Mit steigendem Gehalt an Terephthalsäure werden höhere Schmelzpunkte des Copolyesters bei gleichzeitig niedrigeren Abbauraten gemessen. Einen optimalen Kompromiß zwischen biologischer Abbaubarkeit (Abbau innerhalb von 8 - 12 Wochen in Erde und Kompost) und guten Materialeigenschaften (flexible Filme, Schmelzpunkte von 90 - 140°C) stellen BTA-Copolyester dar, die 30 bis 60% Terephthalsäure in der Säurekomponente enthalten (WITT et al. 1995). Abiotische Hydrolyseeffekte, die mit Hilfe von Sterilkontrollen untersucht wurden, erleichtern den mikrobiellen Angriff dieser Copolyester bei höheren Tempe-



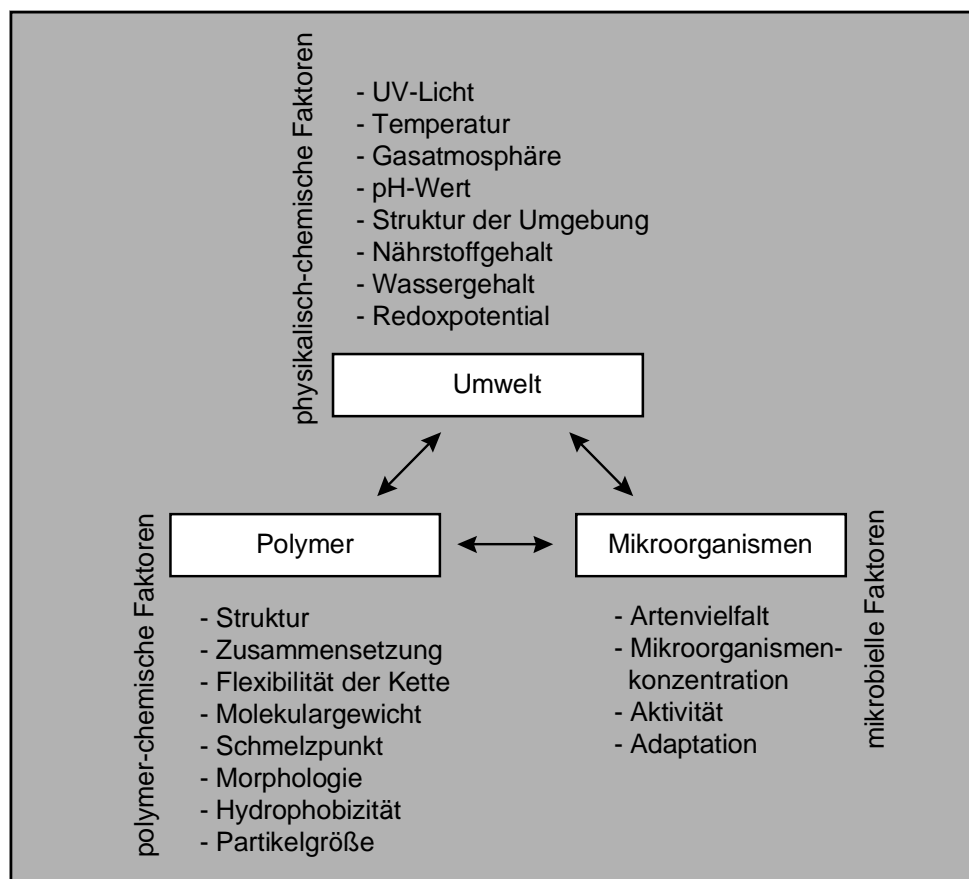


Bild 3.4 Faktoren, die den biologischen Abbau von Kunststoffen unter natürlichen Bedingungen beeinflussen.

### 3.2.2 Umwelt

Physikalisch-chemische Faktoren der Umwelt, wie sie in Bild 3.4 aufgelistet werden, haben sowohl direkten Einfluß auf die Abbaubarkeit des Polymers als auch auf die mikrobielle Population. Durch abiotische Hydrolyse (pH-Wert, Wassergehalt), Photooxidation (UV-Licht) oder physikalische Desintegration (Temperatur, mechanische Zerkleinerung von Grünabfällen inklusive Kunststoffen zur Vorbereitung der Kompostierung) kann der nachfolgende Bioabbau durch Vergrößerung der dem mikrobiellen Angriff zugänglichen Polymeroberfläche oder durch Reduzierung des Molekulargewichtes positiv beeinflusst werden (PALMISANO and PETTIGREW 1992). Auch die Entwicklung der Mikroorganismenpopulation (ihre Artenvielfalt, Mikroorganismenkonzentration, Aktivität und Adaptationsfähigkeit) ist in hohem Maße abhängig von den in Bild 3.4 genannten physikalisch-chemischen Faktoren (AUGUSTA et al. 1992, PALMISANO and PETTIGREW 1992). Umgekehrt beeinflussen z.B. der Zerfall der Polymere in kleine Partikel oder die Metabolisierung der Polymere zu wasserlöslichen Produkten die Struktur, den pH-Wert und den

Nährstoffgehalt der Umgebung - ganz abgesehen von dem Gefährdungspotential, das die Polymere für die Umwelt z.B. durch Akkumulation langlebiger, unter Umständen toxischer Metabolite darstellen. Mikroorganismen wiederum können entweder direkt durch Ausscheidung von Stoffwechselprodukten (z.B. Säuren) oder indirekt durch Sekretion von Enzymen, die die Bildung reaktiver Reagenzien in der Umgebung katalysieren, Änderungen der Umweltbedingungen bewirken (LENZ 1993).

### **3.2.3 Einfluß der Polymereigenschaften auf die Bioabbaubarkeit**

Hochmolekulare technisch genutzte Polymere sind in der Regel einem biologischen Angriff nicht zugänglich, insbesondere wenn deren Hauptkette wie z.B. bei Polyethylen, Polypropylen und Polystyrol aus reinen C-C-Bindungen besteht (AMINABHAVI et al. 1990). Natürliche Polymere wie Proteine, Cellulose, Stärke und Lignin enthalten demgegenüber Heteroatome (Sauerstoff, Stickstoff) in der Polymerkette, die in biologischen Systemen Angriffspunkte für enzymatische Hydrolysen und Oxidationen bieten. So finden sich unter den als biologisch abbaubar bezeichneten, technisch genutzten Polymeren im wesentlichen solche, die C-O- oder C-N-Bindungen in der Polymerkette enthalten (HUANG 1985, 1989; KAWAI 1995). Die Hydrolysierbarkeit von Bindungen in der Polymerkette folgt nach KAWAI (1995) der Reihenfolge Ester > Ether > Amide > Urethane. Eines der wenigen als bioabbaubar angesehenen Polymere mit reinen C-C-Bindungen in der Hauptkette ist der Polyvinylalkohol (PVOH). Hier erfolgt der Abbau über eine primäre Oxidation der OH-Gruppen mit einer anschließenden - dem Fettsäureabbau ähnlichen - Spaltung der Hauptkette (SAKAI et al. 1986).

Polymere mit aromatischen Komponenten oder verzweigten Bereichen tendieren zu einer größeren Resistenz gegenüber dem mikrobiellen Angriff als geradkettige, aliphatische Komponenten (AMINABHAVI et al. 1990). Für eine enzymatische Hydrolyse muß die Polymerkette flexibel genug sein, um in das aktive Zentrum des abbauenden Enzyms hineinzupassen. Dies gilt als Erklärung für den leichten biologischen Abbau der flexiblen aliphatischen Polyester, während sich die starren aromatischen Polyester einem biologischen Abbau widersetzen (HUANG 1985, 1989). Einen analogen Effekt beobachtet man bei Polyamiden. Hier wird die Einschränkung der Kettenflexibilität durch intermolekulare Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen bewirkt. Copolymere aus aliphatischen und aromatischen Polyestern sowie aus Amiden und Estern sind im allgemeinen einem mikrobiellen Angriff zugänglich. Die Abbauraten dieser Verbindungen steigen mit zunehmendem Gehalt an aliphatischen Komponenten oder mit zunehmendem Estergehalt (HUANG 1989, KAWAI 1995). Quervernetzungen in Polymeren limitieren die Mobilität der Polymerkette und damit die Erreichbarkeit des Polymers durch das Enzym, was gleichfalls zur Beeinträchtigung der Abbauraten führt (HUANG 1989).

Während die chemische Struktur und die Zusammensetzung der Polymere die grundsätzliche Bioabbaubarkeit bestimmen, beeinflussen die physikalischen Eigenschaften der Polymere im wesentlichen die Geschwindigkeit des biologischen Abbauprozesses (HUANG 1985, 1989). Aus Untersuchungen von TOKIWA und SUZUKI (1978) und HUANG (1985, 1989) lassen sich einige Tendenzen ableiten:

- Sehr niedrige Molmassen der Polymere begünstigen den Abbau.
- Bei vergleichbaren Abbauprozessen werden Polymere mit niedrigen Schmelzpunkten besser abgebaut als solche mit hohen Schmelzpunkten.
- Amorphe Bereiche im Polymer werden schneller angegriffen als kristalline Bereiche.
- Polymere mit hydrophilen Oberflächen werden besser abgebaut als hydrophobe Materialien.
- Die Abbaugeschwindigkeit nimmt mit abnehmender Partikelgröße (=größere Oberfläche) zu.

### 3.2.4 Mikrobieller Abbau von makromolekularen Strukturen

Mikroorganismen spielen aufgrund ihrer großen Anzahl, ihrer metabolischen Vielseitigkeit und ihrer extrem hohen metabolischen Umsatzraten eine wichtige Rolle in den Stoffkreisläufen der Natur (HUANG 1989). In ihrer Gesamtheit gelten sie als „biochemisch omnipotent“. Für jede noch so komplizierte, biosynthetisch entstandene Verbindung existiert ein Mikroorganismus, der zu ihrem teilweisen oder vollständigen Abbau befähigt ist. Die entstandenen Bruchstücke werden gegebenenfalls von anderen Arten verwertet. Man spricht von dem „Prinzip der mikrobiellen Unfehlbarkeit“ (SCHLEGEL 1992, S. 402).

Viele chemisch synthetisierte Substanzen wie Pestizide, Herbizide und Kunststoffe (sogenannte Xenobiotika) kommen in der Umwelt nicht vor und widerstehen häufig dem mikrobiellen Angriff. Damit diese von Menschenhand geschaffenen Substanzen einem mikrobiellen Abbau zugänglich werden, müßten sich Mikroorganismen mit entsprechenden Stoffwechselleistungen entwickeln (BROCK und MADIGAN 1991, S. 654-657). Eine Alternative stellt die Synthese neuartiger Verbindungen dar, in die dem mikrobiellen Angriff zugängliche Gruppen von vornherein eingebaut werden. Wie bereits in Kap.3.2.3 angedeutet, unterliegen im allgemeinen nur solche synthetischen Polymere einem biologischen Abbau, die im Rückgrat ihrer Polymerkette Ester-, Ether- oder Amidbindungen enthalten, d.h., an in der Natur vorkommende Strukturen erinnern.

In Bild 3.5 sind die Vorgänge des mikrobiellen Abbaus synthetischer Polymere im Gegensatz zu dem allgemein gehaltenen Schema aus Kap.3.2.1 (Bild 3.4) von der Seite der Mikroorganismen aus dargestellt. Polymere sind zu große Verbindungen, als daß sie die Zellwände der Mikroorganismen passieren könnten. Damit Bakterien und Pilze derartige

Substanzen als Nährstoffe verwenden können, müssen sie Enzyme produzieren, die - nach dem Transport durch die Zellwand - außerhalb der Zelle wirken. Die Enzyme zerlegen diese unlöslichen Makromoleküle „schichtweise“ von der Oberfläche her in kurzketige Bruchstücke. Dabei muß der Organismus, der das polymerspaltende Enzym produziert, nicht unbedingt direkter Verbraucher dieser Spaltprodukte sein. Andere Organismen der Population können in den Abbauvorgang eingreifen, die niedermolekularen Verbindungen in die Zelle aufnehmen und zu  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  und Biomasse umsetzen. Durch Ausscheidung für sie unbrauchbarer oder nicht nutzbarer Stoffwechselprodukte (z.B. Säuren), versorgen sie unter Umständen wiederum andere Mikroorganismen mit Nährstoffen. Auf diese Art der kooperativen Zusammenarbeit verschiedener Mikroorganismen erfolgen viele Abbauvorgänge in der Natur. Es kann aber auch zur Akkumulation nicht weiter abbaubarer Spaltprodukte der Polymere kommen, die aufgrund möglicher toxischer Wirkungen (Inhibierung, Abtötung) unter Umständen ein Gefährdungspotential für die Mikroorganismen darstellen.

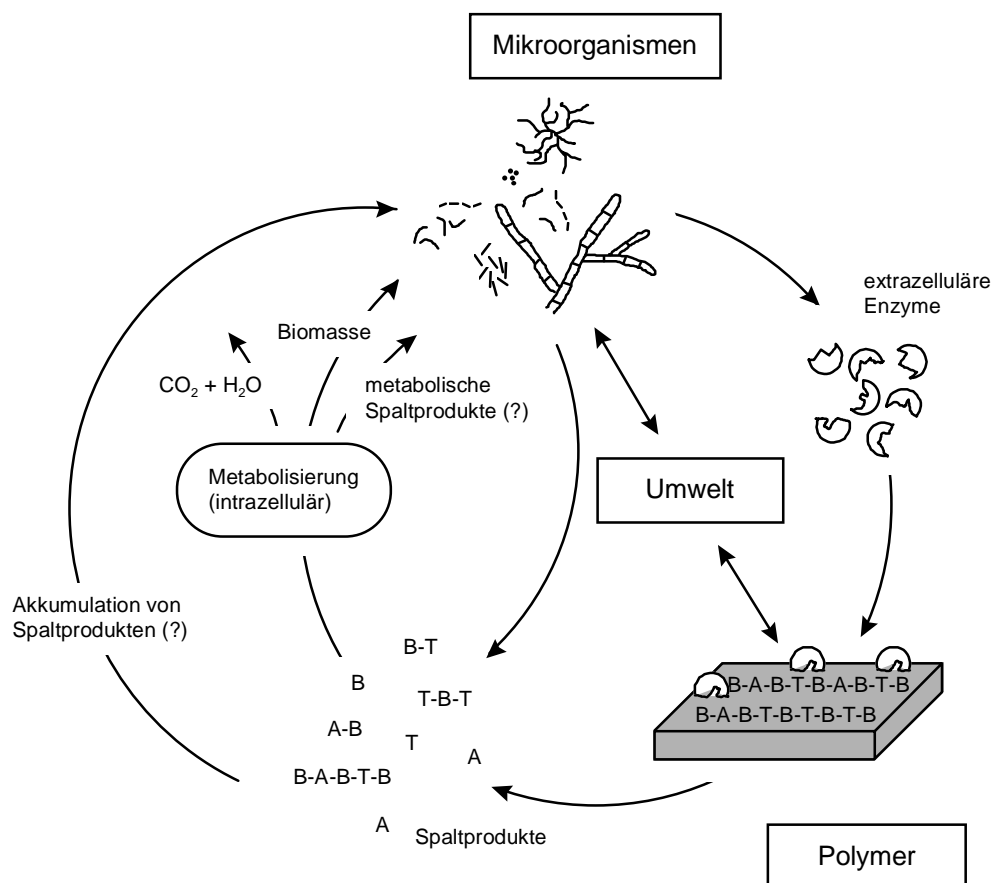


Bild 3.5 Schematische Darstellung des mikrobiellen Abbaus synthetischer Polymere.



### 3.3 Isolierung von polymerabbauenden Reinstämmen

Die Mannigfaltigkeit der Mikroorganismen in Bezug auf ihre Stoffwechseltypen bietet ein gewaltiges Abbaupotential in der Umwelt. Dabei existieren viele Organismen, die nicht nur natürlich vorkommende Verbindungen, sondern auch Xenobiotika zu metabolisieren vermögen. Um derartige Mikroorganismen zu isolieren, hat sich die vom Prinzip und in der Praxis sehr einfache Methode der Anreicherungskultur bewährt, die von den Mikrobiologen Winoogradsky und Beijerinck entwickelt wurde (SCHLEGEL 1992, S.182; BROCK und MADIGAN 1991, S. 614).

Eine Anreicherung gewünschter Organismen wird erreicht, indem durch Wahl des Mediums (Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle) und ganz bestimmter Umweltbedingungen (Gasatmosphäre, Temperatur, Licht usw.) ein gezielter Konkurrenzdruck auf die Organismen ausgeübt wird. In einer mit einer Mischpopulation beimpften Kultur setzt sich der am besten angepaßte Typ durch. Dem Wachstum von Begleitorganismen, die die Ausscheidungs- oder Autolyseprodukte der primär begünstigten Zellen nutzen würden, wird durch häufige, nach kurzen Intervallen erfolgende Überimpfungen vorgebeugt. Durch diese mehrfache Übertragung auf die gleiche Nährlösung und die parallele Kultivierung auf festen Nährböden der gleichen Zusammensetzung läßt sich der angereicherte Stamm vereinzeln und isolieren.

Für den Erfolg einer Anreicherung kann es von großem Vorteil sein, Impfmateriel von einem Standort zu wählen, an dem bereits eine natürliche Anreicherung eingetreten ist. Außerdem ist es wichtig, daß nicht mehr als die minimalen Bedürfnisse des anzureichernden Stoffwechseltyps erfüllt werden. So können Organismen isoliert werden, die eine spezifische organische Verbindung zu nutzen vermögen, indem ihnen ein Mineralsalzmedium angeboten wird, das eben jene Verbindung als alleinige oder hauptsächliche Kohlenstoff- und Energiequelle enthält.

Dieses Verfahren wurde von vielen Autoren für die Suche nach polymerabbauenden Organismen angewendet, so z.B. zur Isolierung von Mikroorganismen, die Polycaprolacton, Polyhydroxybuttersäure, Polyethylenbernsteinsäure und Polycarbonat abbauen (BENEDICT et al. 1983, JENDROSSEK et al. 1993, TANSENGCO and TOKIWA 1998, SUYAMA et al. 1998). Im allgemeinen wird dabei aus der flüssigen Anreicherungskultur auf Agarmedien überimpft, in denen das Polymer pulverförmig suspendiert ist, so daß homogen trübe Agarplatten vorliegen. Potentiell polymerabbauende Mikroorganismen können durch die Bildung von Klärungshöfen, sogenannter „Clear Zones“, die bei der Polymerspaltung durch extrazelluläre Enzyme erscheinen, identifiziert und vereinzelt werden. Zu beachten ist, daß das Auftreten der Clear Zones lediglich die Depolymerisierung, d.h. die Spaltung der Polymerkette anzeigt, jedoch keinen Beweis für eine Metabolisierung des Polymers darstellt.

## 3.4 Polyesterspaltende Enzyme

### 3.4.1 Klassifikation

#### 3.4.1.1 Allgemeines

Die internationale Klassifikation der Enzyme erfolgt aufgrund der von ihnen katalysierten Reaktionen in sechs Klassen: Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen (LEHNINGER 1987, S. 233). Polyesterspaltende Enzyme gehören zur dritten Gruppe, den Hydrolasen. Sie katalysieren hydrolytische Spaltungen von C-O- und C-N-Bindungen. Die Hydrolyse selbst kann als Transfer einer spezifischen Gruppe auf den Akzeptor Wasser betrachtet werden. Einige Hydrolasen (speziell einige der Esterasen, Glykosidasen und Proteinasen) bereiten Probleme hinsichtlich ihrer weiteren Klassifikation in Unterklassen, da sie eine sehr breite Spezifität besitzen (WEBB 1992, S. 11).

3. Hydrolasen	
3.1 Reaktionen mit Esterbindungen	
3.1.1 carboxylische Esterhydrolasen	
3.1.1.1 Carboxylesterase	
...	3.1.1.3 Triacylglycerol-Lipase
...	3.4 Reaktionen mit Peptidbindungen (Peptidasen)
...	3.4.21 Serin-Endopeptidasen
	3.4.21.1 Chymotrypsin
	3.4.21.2 Chymotrypsin C
...	3.4.21.4 Trypsin

Bild 3.6

Klassifikation hydrolytischer Enzyme  
(nach WEBB 1992).

Serin-Hydrolasen, zu denen Lipasen, Esterasen, PHB-Depolymerasen und Serin-Endopeptidasen gezählt werden, ist die Existenz der Sequenz Gly-X-Ser-X-Gly gemeinsam (ANTONIAN 1988, BRADY et al. 1990, JENDROSSEK et al. 1995b, SCHIRMER et al. 1995, ARPIGNY et al. 1998). Das katalytische Zentrum besteht aus einer Triade - Serin, Histidin, und Asparagin - und einiger weiterer Oxyanion-stabilisierender Reste. Die katalytischen Mechanismen innerhalb dieser Gruppe von esterspaltenden Enzymen sind einander sehr ähnlich (KAZLAUSKAS und BORNSCHEUER 1998). Die Hydroxylgruppe des Serins aus dem aktiven Zentrum wirkt als Nucleophil, das die Esterbindung des Substrates angreift. Wenn das Serin aus der Sequenz Gly-X-Ser-X-Gly z.B. durch Alanin ersetzt wird, sind die Enzyme unfähig, das Substrat anzugreifen (SCHIRMER et al. 1995).

### 3.4.1.2 Carboxylische Esterhydrolasen

In der Natur katalysieren Esterasen (Carboxylesterasen, EC 3.1.1.1) die Hydrolyse von Carboxylsäureestern, während Lipasen (Triacylglycerol-Lipasen, EC 3.1.1.3) die Hydrolyse von Triglyceriden (Fetten), zu Glycerol und Fettsäuren katalysieren. Ein wichtiger Unterschied zwischen diesen beiden Enzymgruppen ist in ihrer physikochemischen Wechselwirkung mit ihren Substraten zu sehen (PHYTHIAN 1998).

Esterasen zeigen eine normale Michaelis Menten Aktivität. Sie arbeiten in echten Lösungen. Im Gegensatz dazu katalysieren Lipasen die Hydrolyse von schlecht wasserlöslichen Substraten. Sie zeigen eine geringe Aktivität solange die Konzentration der Substrate unterhalb ihrer Löslichkeitsgrenze liegt, also nur ein Einphasensystem vorliegt. Ihre Aktivität steigt jedoch sprunghaft an, sobald sich, bei Erhöhung der Substratkonzentration, eine Wasser-Öl-Grenzfläche bildet. Diese Steigerung der katalytischen Wirkung der Lipasen wird „Grenzflächenaktivierung“ genannt (PHYTHIAN 1998, KAZLAUSKAS und BORNSCHEUER 1998). Nach MARTINEZ et al. (1992) hat das Phänomen der Grenzflächenaktivierung eine strukturelle Ursache: ein hydrophober Deckel, der das katalytische Zentrum verdeckt, wird bei der Substrat-Bindung verschoben und interagiert dabei wahrscheinlich mit der lipiden Matrix.

### 3.4.1.3 Serin-Endopeptidasen

Peptidasen sind Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren. Ihre Spezifität ist im allgemeinen schwer zu definieren. Sie ist abhängig einerseits von der Natur der Aminosäurereste, die sich um die zu hydrolysierende Peptidbindung herum befinden und andererseits auch von der Konformation der Polypeptidkette des Substrates. Man unterscheidet Exopeptidasen, die Aminosäuren von den Enden der Peptidketten abspalten und Endopeptidasen (= Proteinasen), die Bindungen innerhalb der Peptidkette spalten (WEBB 1992, S. 371). Einige Proteinasen besitzen ebenfalls Esterase-Aktivität und sind fähig, die Hydrolyse und die Bildung der Esterbindung zu katalysieren (PHYTHIAN 1998).

Die Enzyme der Serin-Endopeptidasen besitzen ein Serin im aktiven Zentrum, das an der katalytischen Reaktion beteiligt ist (WEBB 1992, S. 371).  $\alpha$ -Chymotrypsin und Chymotrypsin sind Beispiele für derartige Enzyme. Sie hydrolysieren die Amidbindungen in Proteinen an aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan und können gleichfalls die Hydrolyse von Esterbindungen katalysieren, was in bestimmten Substraten sogar schneller vonstatten geht als die Spaltung der Peptidbindungen (PHYTHIAN 1998, STELLMACH et al. 1988, S. 97; LENZ 1993). So erhielten SAOTOME et al. (1991) nach einer zwölfstündigen Inkubation von Polymeren aus  $\alpha$ -Aminosäuren, 1,2-Ethandiol und Adipinsäure mit Chymotrypsin als Abbauprodukt das di-(L-Phenylalanin)amid der

Adipinsäure. Phenylalanin wurde nicht detektiert. Dies zeigte an, daß Chymotrypsin in diesem Fall vorrangig die Esterbindungen hydrolysierte.

### 3.4.2 Definitionen

#### 3.4.2.1 Extrazelluläre Enzyme

Der erste Schritt eines Polymerabbaus muß aufgrund der Größe der polymeren Substanz außerhalb der Zelle durch extrazelluläre Enzyme erfolgen. Dabei lassen sich zwei grundsätzliche Mechanismen unterscheiden (LENZ 1993). In dem einen Fall werden die Polymere durch freie, in die Umgebung diffundierende Enzyme in wasserlösliche, niedermolekulare Fragmente gespalten, die ihrerseits im wäßrigen Milieu diffundieren und von den Mikroorganismen aufgenommen werden. Im anderen Fall sind die Enzyme adsorptiv oder kovalent an die Zellwand gebunden. Die Mikroorganismen müssen sich eng an die Polymeroberfläche anlagern, um die immobilisierten Enzyme mit dem Substrat so in Kontakt zu bringen, daß diese reagieren können.

#### 3.4.2.2 Exo- und Endoenzyme

Wie in Bild 3.7 dargestellt, können enzymkatalysierte chemische Reaktionen entweder durch sukzessiven Angriff der Polymerketten-Enden (Exoenzyme) oder durch Spaltungen innerhalb der Polymerkette (Endoenzyme) erfolgen. Im Fall der Exoenzyme, bei denen entweder Mono-, Di- oder Trimere abgespalten werden, hat die Kettenlänge (Molmasse) des Polymers einen großen Einfluß auf die Abbaurate, während im Fall der Endoenzyme, bei denen Oligomere oder niedermolekulare Polymere entstehen, nur ein recht geringer Einfluß der Molmasse festgestellt werden kann (HUANG 1989).

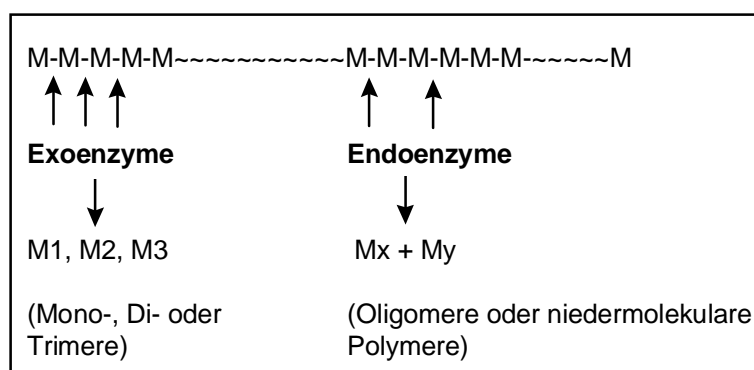


Bild 3.7

Exo- und endogene Polymerspaltung (LENZ 1993).

### 3.4.3 Enzymreinigung

#### 3.4.3.1 Auswahl der Methoden

Extrazelluläre, polyesterspaltende Enzyme spielen eine Schlüsselrolle im mikrobiellen Abbauprozess des BTA-Copolyesters. Aussagen zu der Natur eines solchen Enzyms, seiner Substratspezifität und anderer Eigenschaften setzen die Reinigung des Proteins voraus. Da vermutet wurde, daß es sich bei dem BTA-spaltenden Enzym um eine Hydrolase handelt, wurden für derartige Enzyme allgemein übliche, in der Literatur beschriebene Methoden (Tabelle 3.2), wie die Ionenaustauschchromatographie und die hydrophobe Interaktionschromatographie, zur Reinigung der BTA-Hydrolase herangezogen.

Tabelle 3.2 In der Literatur beschriebene Vorgehensweisen zur Reinigung bakterieller Hydrolasen.

Enzym	Reinigungsverfahren	Literatur
Lipasen	⇒ GF, GF	TAIPA 1992 (review)
	⇒ ASP, GF, IEXC (K), IEXC (A)	
	⇒ UF, IEXC (A), HIC, IEXC (A)	
	⇒ ASP, IEXC (A), HIC	
	⇒ ASP, HIC, GF	
PHB-Depolymerasen	⇒ ASP, IEXC (A), HIC	JENDROSSEK et al. 1993
	⇒ ASP, IEXC (A), IEXC (A), GF	JENDROSSEK et al. 1995a
	⇒ IEXC (A), HIC	SCHIRMER et al. 1995
Cutinasen	⇒ AP, IEXC (A), IEXC (A), HIC, GF	SEBASTIAN und KOLATTUKUDY 1988
Xylanasen	⇒ ASP, GF, IEXC (A)	BERENS et al. 1996
	⇒ IEXC (A), GF	BACHMANN und MCCARTHY 1991

A: anion exchange, AP: acetone precipitation, ASP: ammoniumsulfate precipitation, GF: gel filtration, HIC: hydrophobic interaction chromatography, IEXC: ion exchange chromatography, K: kation exchange

#### 3.4.3.2 Ionenaustauschchromatographie (IEXC)

Die Ionenaustauschchromatographie ist das häufigste zur Trennung biologischer Moleküle eingesetzte Verfahren. Es beruht auf der reversiblen Adsorption gelöster, geladener Moleküle an gegensätzlich geladene, kovalent an eine Matrix gebundene Gruppen. Die Trennung von Proteinen erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladungen, die durch unterschiedliche Anteile von Aminosäuren mit positiv (Lysin, Arginin, Histidin) und negativ geladenen Seitenketten (Asparaginsäure, Glutaminsäure) bedingt sind (STRYER 1990, S. 20). In der Theorie sind zwei generelle Methoden zur Elution der Proteine möglich. Diese sind (a) Änderung des pH-Wertes, was zur Ladungsänderung des Proteins und damit

Schwächung der Bindung führt, und (b) eine Steigerung der Ionenstärke, wodurch die Konkurrenz um Bindungsplätze erhöht und damit elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und Säulenmaterial geschwächt werden (SCOPES 1987, S. 110, PHARMACIA 1997a).

Die Vorteile dieser Methode beruhen auf ihrer breiten Anwendbarkeit, ihrer leistungsstarken Trennwirkung sowie der Einfachheit und Kontrollierbarkeit in der Durchführung. Die Proben lassen sich schnell und gut reproduzierbar konzentrieren (PHARMACIA 1997a).

#### **3.4.3.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)**

Eine zur Trennung von Proteingemischen anwendbare Eigenschaft ist die Fähigkeit der Proteine aufgrund von oberflächenständigen, unpolaren Seitenketten verschiedener Aminosäuren (Ala, Val, Leu, Ileu, Pro, Phe, Met, Trp) mit hydrophoben Liganden Wechselwirkungen einzugehen. Diese hydrophoben Wechselwirkungen werden mit zunehmender Salzkonzentration verstärkt, so daß nach SCOPES (1987, S. 176) die HIC - in Abhängigkeit von der Salzkonzentration - prinzipiell auf alle Proteine anwendbar ist. Die genauen Mechanismen dieser Methode sind bislang nicht bekannt.

Die Erniedrigung der Salzkonzentration führt im allgemeinen zur Elution der Proteine. Gegebenenfalls kann die Elution der Proteine durch Zugabe geringer Konzentrationen wasserlöslicher organischer Lösungsmittel (z.B. Ethylenglykol, Dimethylformamid und Isopropanol) verbessert werden. Durch die Lösungsmittel wird die Polarität und die Oberflächenspannung des Elutionspuffers herabgesetzt, was zur Schwächung der Protein-Liganden-Wechselwirkungen führt (PHARMACIA 1997b).

Die HIC ist eine effiziente und schonende Methode zur Reinigung von Proteinen, mit der gleichzeitig eine Konzentrierung der Probe erreicht werden kann. Nach MUKAI und DOI (1995) eignet sich diese Methode besonders gut zur Reinigung von Proteinen mit großen hydrophoben Oberflächen.

## 4 Untersuchungen und Ergebnisse

### 4.1 Isolierung polyesterspaltender Mikroorganismen

#### 4.1.1 Entwicklung des Isolierungsverfahrens

Im Folgenden werden die Problemstellung und die grundsätzliche Vorgehensweise zur Isolierung polyesterspaltender Mikroorganismen vorgestellt. Die einfachste Methode stellt die Technik der Anreicherungskultur dar (Kap.3.3). Um polymerabbauende Mikroorganismen aus einer geeigneten Mischpopulation zu isolieren, werden die Polymere im allgemeinen als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle in Mineralsalzmedien angeboten.

In dem vorliegenden Fall wurde nach Organismen gesucht, die zur Hydrolyse des synthetischen Copolyesters BTA 40/60 fähig sind. Dieser Copolyester verfügt über stark hydrophobe Oberflächen, was in wässrigen Lösungen zur starken Agglomeration von Kunststoffpartikeln im Mikrometerbereich führt. Aus diesem Grund war es zu Beginn der Arbeit nicht möglich, mit dem BTA-Copolyester homogen trübe Polymer-Agarplatten zur Vereinzelung polyesterspaltender Organismen herzustellen, wie sie z.B. als PHB-Agarplatten von JENDROSSEK et al. (1993) zur Isolierung PHB-depolymerisierender Organismen eingesetzt wurden. Das Isolierungsverfahren wurde deshalb leicht abgewandelt und in vier Schritte unterteilt: der Gewinnung des Inokulums, der Anreicherung polyesterspaltender Mikroorganismen unter Kulturbedingungen, der Isolierung einzelner Mikroorganismen-Stämme und der „Rücktestung“ dieser Reinstämme hinsichtlich der Copolyesterhydrolyse (Bild 4.1).

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Inokula wurde Kompost aus Grünabfällen gewählt, da die grundsätzliche biologische Abbaubarkeit des BTA-Copolyesters im Kompost bereits nachgewiesen (WITT et al. 1995) und damit die Chance groß war, in diesem Material entsprechende Mikroorganismen zu finden. Zur Simulierung einer „natürlichen Anreicherung“ wurden Copolyester-Filme in Kompostreaktoren eingegraben, damit sich in ihrer Umgebung polyesterabbauende Mikroorganismen bevorzugt vermehren konnten. Dieses Verfahren ist allerdings nicht mit der Anreicherungskultur zu verwechseln, da der Kompost ringsum genügend Nährstoffe für das Wachstum von Begleitorganismen bietet und dementsprechend nur ein mäßiger Konkurrenzdruck aufgebaut wird. Der biologische Belag auf diesen Polyester-Filmen und der Kompost aus diesen Reaktoren wurden nach mehrwöchiger Inkubation zur Herstellung von Inokula für die eigentlichen Anreicherungskulturen eingesetzt. Parallel zu dieser Prozedur der „Voradaptierung“ wurden auch Anreicherungskulturen direkt mit aus frischem Kompost hergestellten Eluaten beimpft.

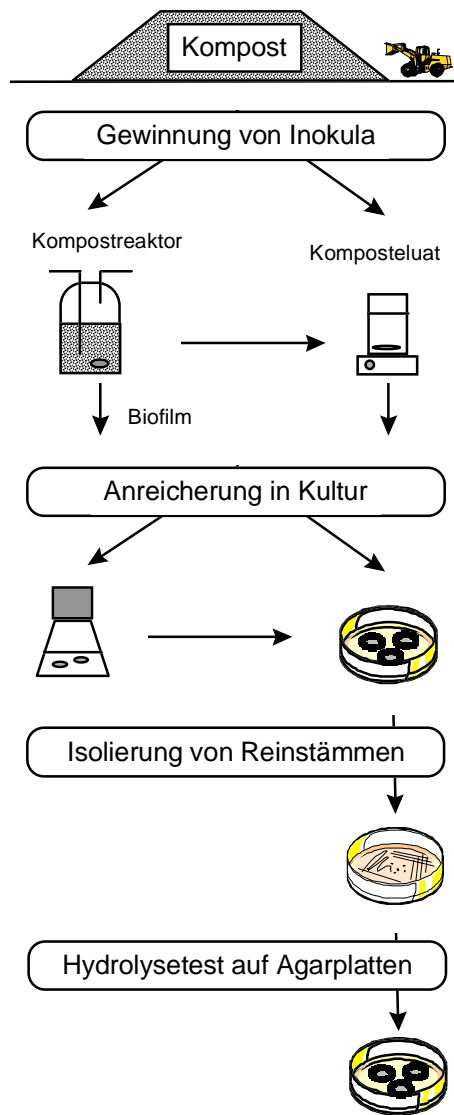


Bild 4.1

Schematische Darstellung des Isolierungsverfahrens.

Zur Anreicherung BTA-hydrolysierender Mikroorganismen in Kultur wurden Flüssigkulturen und Agarplatten mit den Inokula beimpft und mit BTA-Filmen versetzt. Das Ziel war, durch mehrfache Subkultivierung eine Anreicherung BTA-hydrolysierender Mikroorganismen gegenüber den Begleitorganismen zu erreichen.

Im Rahmen der Optimierung des Isolierungsverfahrens wurden hierzu drei verschiedene nährstoffarme Agarmedien getestet, zwei Mineralsalzmedien (MinB, MSA) und ein Kompostextraktmedium (KEA). Als Inokula dienten vier Anreicherungskulturen (2/5, K1, K2, K3; Tabelle 7.4). Es handelte sich dabei um Mischkulturen aus Komposteluaten, die zur Anreicherung BTA-hydrolysierender Stämme in flüssigem Mineralsalzmedium (MinB) mit BTA-Filmen als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert wurden. Pro Agarmedium und Anreicherungskultur wurden drei BTA-Filme beimpft und 2 Wochen bei 55°C inkubiert. Die in Bild 4.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß auf allen getesteten Medien Hydrolyseaktivitäten der Mischpopulationen zu beobachten waren. Auffällig waren die guten Ergebnisse der BTA-Hydrolyse durch die vier Mischkulturen auf Kompostextraktagar (KEA). In einem Zeitraum von zwei Wochen desintegrierten die Anreicherungskulturen K2 und 2/5 BTA-Filme zu 100%. Das Wachstum der Kolonien war auf diesem Medium besser als auf den reinen Mineralsalzmedien, so daß die Erkennung und Vereinzelung verschiedener Mikroorganismen-Stämme erleichtert wurde. Die Ursache für die guten Ergebnisse mit dem Kompostextraktmedium könnte einerseits in einer „angepaßteren“ Nährstoffversorgung liegen: Die Mischpopulationen wurden aus Kompostproben gewonnen und kamen auf diesem Agarmedium in ein naturähnliches Nährstoffmilieu zurück. Andererseits könnte es auf einen Co-Metabolismus hinweisen, da im Kompostextrakt wahrscheinlich in geringen Mengen zusätzliche Energie- und Kohlenstoffquellen enthalten sind, die den Mineralsalzmedien fehlen. Dennoch zeigte die Anreicherungskultur K3 gerade auf dem Mineralsalzmedium MinB die beste Hydrolyse und wurde über MSA hin zu KEA immer schlechter, weshalb in weiteren Anreicherungskulturen auf keines der drei genannten Medien verzichtet wurde.



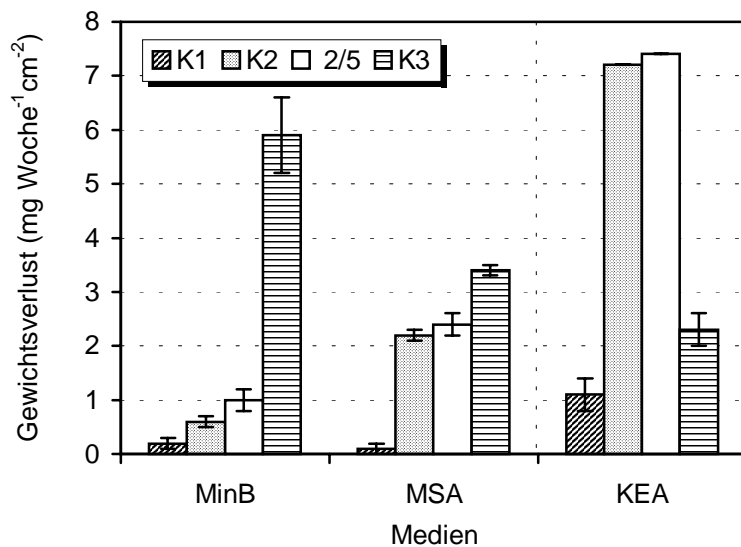


Bild 4.2

Hydrolyse von BTA-Filmen durch vier Anreicherungskulturen (2/5, K1, K2, K3) auf unterschiedlichen nährstoffarmen Agarmedien.

Testansatz: BTA-Filme (BTA 40/60,  $\varnothing = 2,5$  cm,  $m_a = 35 \pm 5$  mg,  $n = 3$ ), 14 d, 55°C.

Da zunächst keine homogen trüben BTA-Agarplatten herstellbar waren, erfolgte die Isolierung von Reinstämmen, d.h. die Vereinzelung der Mikroorganismen, zunächst ohne gleichzeitige Kontrolle ihrer Fähigkeit zur BTA-Hydrolyse. Von Bereichen zersetzter BTA-Filme auf den Anreicherungsagarplatten (MinB, MSA und KEA) wurde Organismenmaterial abgepickt und auf verschiedenen Komplexmedien ausgestrichen (Kap.7.2.2.3 und 7.2.3.2). Das Angebot an Komplexmedien wurde relativ groß gehalten, um möglichst vielen Mikroorganismen in ihren unterschiedlichen Nährstoffansprüchen gerecht zu werden. Auf diesen Komplexmedien war ein gutes Koloniewachstum zu beobachten, was wichtig für eine Unterscheidung verschiedener Mikroorganismen-Stämme und somit notwendig für die Gewinnung von Reinkulturen war.

Im letzten Schritt des Isolierungsverfahrens, dem „Hydrolysetest auf Agarplatten“, wurden die isolierten Reinstämme auf ihre BTA-Hydrolyseleistungen getestet. Wiederum war es wichtig, den unbekannten Kulturen verschiedene Medien anzubieten. In Bild 4.3 sind beispielhaft die Ergebnisse der BTA-Hydrolyse einiger Isolate dargestellt.

Es wurden grundsätzlich vier verschiedene nährstoffarme Medien in den Hydrolysetest eingesetzt (Kap.7.2.3.3). Das Mineralsalzmedium MSV, das dem Isolat K7a-3 hervorragende Bedingungen für die BTA-Hydrolyse bot, erwies sich als ungeeignet für die Beurteilung der Hydrolyseleistung von Isolat K6a. Andererseits wäre der Stamm K7a-3 nur als schwach hydrolysierender Organismus beurteilt worden, wenn ausschließlich das Medium MSA zum Testen verwendet worden wäre. Eine generelle Einteilung der vier Medien als besonders günstig oder ungünstig konnte nicht abgeleitet werden.

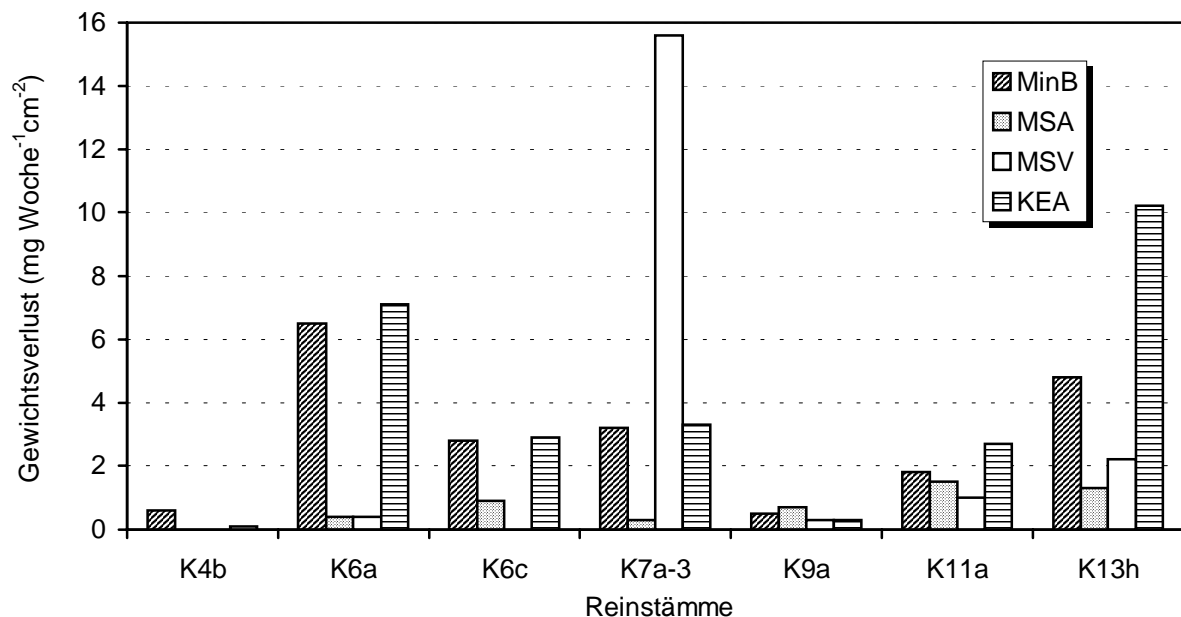


Bild 4.3 Hydrolyseleistungen einiger Reinstämme auf vier verschiedenen Agarmedien (drei Mineralsalz- und ein Kompostextraktmedium).  
Testansatz: BTA-Filme (BTA 40/60,  $\varnothing = 2,5$  cm,  $m_a \approx 80$  mg,  $n = 2$ ), 14 d, 55°C.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß der Gewichtsverlust der BTA-Filme in dem beschriebenen Hydrolyseversuch lediglich eine Desintegration der Filme anzeigt, die durch die Spaltung der Polyesterkette hervorgerufen wird. Ob die Spaltprodukte von den Mikroorganismen metabolisiert werden, muß in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Für die Suche nach polyesterspaltenden Mikroorganismen war diese Methode jedoch einfach in der Durchführung und ausreichend empfindlich.

#### 4.1.2 Ergebnisse der Isolierung

Die Isolierung polyesterspaltender Mikroorganismen aus Kompost geschah aus zweierlei Gründen: da die Kompostierung als primärer Entsorgungsweg z.B. für Verpackungen aus biologisch abbaubaren Werkstoffen gilt, war es einerseits von Interesse, das Abbauverhalten des synthetischen Copolyesters BTA 40/60 im Kompost im Hinblick auf die Vielfalt potentiell abbauender Arten von Mikroorganismen zu überprüfen, andererseits wurde nach Mikroorganismen-Stämmen mit einem möglichst hohen Hydrolysepotential für schnell durchführbare Untersuchungen bezüglich des Polyesterabbaus gesucht.

Insgesamt wurden 61 Stämme aus 14 unterschiedlichen Anreicherungskulturen isoliert. In Bild 4.4 ist die Gesamtzahl der Isolate, die mit den unterschiedlichen Anreicherungskulturen erhalten wurden, der Anzahl der BTA-hydrolysierenden Isolate gegenübergestellt. Es wurde beobachtet, daß eine „Voradaptierung“ der Mikroorganismen unter naturähnlichen Bedingungen, wie dies mit dem Eingraben von BTA-Filmen in Kompostreaktoren bezweckt wurde

(K1 bis K7, siehe Tabelle 7.4), oder eine Anreicherung mit dem Zwischenschritt der BTA-Hydrolyse in Flüssigkultur (Gruppe I, Bild 4.4) nicht erforderlich gewesen wäre.

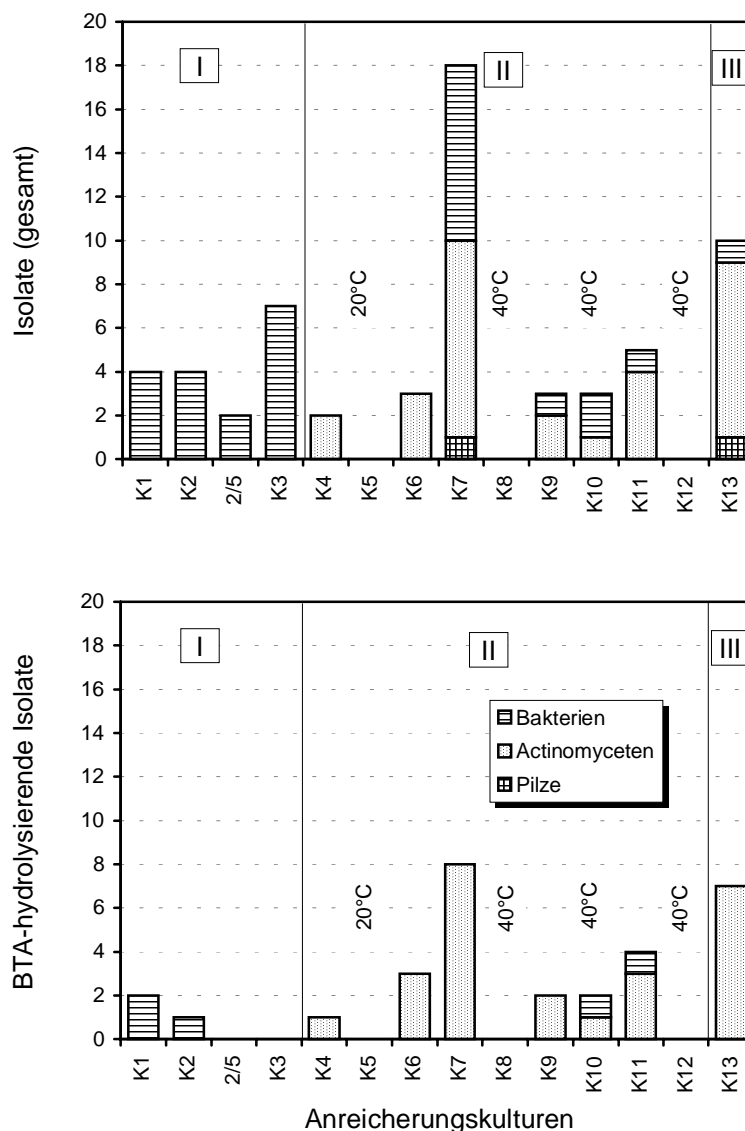


Bild 4.4

Gegenüberstellung der Anzahl der mit den verschiedenen Anreicherungskulturen insgesamt isolierten zu den BTA-hydrolysierenden Mikroorganismen (Kap. 7.2.3.2).

(I) Anreicherung und Isolierung mit Zwischenschritt in Flüssigkultur.

(II) Direkte Anreicherung auf Agarplatten mit BTA-Filmen.

(III) CaCO<sub>3</sub>-Anreicherung von Actinomyceten (Kap.7.2.3.1).

Da Kompostproben aus der Heißrottephase als Mikroorganismenquelle für die Isolierung von Reinstämmen dienten, wurden hauptsächlich thermophile Mikroorganismen isoliert, d.h. Mikroorganismen deren optimale Wachstumstemperaturen oberhalb von 45°C liegen. Die Anreicherungskulturen K5, K8 und K12, die bei 20°C bzw. 40°C inkubiert wurden, waren zwar nicht steril, wie dies nach Bild 4.4 den Anschein haben könnte, doch zeigten die beimpften BTA-Filme keinerlei sichtbare Anzeichen einer Zerstörung, so daß von ihnen keine Stämme isoliert wurden. Immerhin konnten aus der Anreicherungskultur K10 (40°C) vier Stämme isoliert werden, von denen zwei die Fähigkeit zur BTA-Hydrolyse zeigten.

Es wurden verhältnismäßig viele BTA-hydrolysierende Stämme isoliert, wenn Techniken zur Anzucht von Actinomyceten (Gruppe II und III, Bild 4.4) eingesetzt wurden, wie z.B. spe-

zielle Nährmedien (SCK, StIIsoy, GYM<sup>+</sup>, StIME, BHI), Impftechniken (Kap.7.2.3.2) sowie die Zugabe von CaCO<sub>3</sub> zu frischem, getrocknetem Kompost. Die zuletzt genannte Methode bietet den Actinomyceten einen hohen Selektionsvorteil, da Sporen der Actinomyceten die CaCO<sub>3</sub>-Behandlung besser überstehen als vegetative Zellen. Das Isolierungsverfahren hätte demnach stark vereinfacht werden können, doch war dies zu Beginn der Arbeiten nicht abzusehen.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Isolierung hinsichtlich der Hydrolyseleistungen der isolierten Mikroorganismen wird in Tabelle 4.1 gegeben. Von 30 Bakterien, hauptsächlich aerob wachsende Stäbchen mit Endosporenbildung, d.h. zur Gattung *Bacillus* gehörend, waren nur 5 Isolate in der Lage, den Copolyester BTA 40/60 zu spalten. Drei der fünf Stämme lagen mit ihren Hydrolyseleistungen zwar oberhalb der Nachweisgrenze (Tabelle 4.1), doch wurden sie aufgrund ihrer schwachen Leistungen nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt.

Tabelle 4.1 Übersicht über die Anzahl der isolierten, BTA-hydrolysierenden Mikroorganismen.

BTA-Hydrolyse (mg Woche <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> ) <sup>a</sup>	Bakterien	Actinomyceten	Pilze
> 2	-	2	-
1 - 2	-	5	-
0,3 - 1	-	11	-
0,15 - 0,3	2	1	-
0,06 - 0,15	3	6	-
< 0,06 <sup>b</sup>	25	4	2

<sup>a</sup> Die BTA-Hydrolyse wurde auf vier verschiedenen Medien getestet (Kap.7.2.3.3). Es sind jeweils die besten Ergebnisse dargestellt, unabhängig von dem Medium, auf dem sie erreicht wurden.

<sup>b</sup> Ein Gewichtsverlust der Filme von 0,06 mg Woche<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> (entspricht 0,3 mg Wägedifferenz) wird als Nachweisgrenze der Methode angesehen.

Auffällige Ergebnisse der BTA-Hydrolyse zeigte die Gruppe der Actinomyceten, sowohl hinsichtlich der Anzahl der hydrolysierenden Mikroorganismen als auch hinsichtlich der erreichten Hydrolyseleistungen. Actinomyceten sind filamentös wachsende Mikroorganismen und bilden Sporen, die denen der Pilze ähneln. Aufgrund ihrer typischen bakteriellen Zellwand, der Struktur ihrer Kernregion, ihrer Physiologie und ihrer Angreifbarkeit durch Bakteriophagen werden sie eindeutig den Bakterien zugerechnet (CROSS 1968). Nur 4 von insgesamt 29 isolierten Stämmen zeigten keinerlei BTA-Hydrolyseeigenschaften. Mehr als die Hälfte der Isolate wiesen dagegen mit Gewichtsverlusten der BTA-Filme von mehr als 0,3 mg Woche<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> sehr gute Ergebnisse auf. Zwei Stämme mit Hydrolyseleistungen von

mehr als  $2 \text{ mg Woche}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ , Isolate K7a-3 und K13g, wurden identifiziert und in weiterführende Untersuchungen eingesetzt.

Da die meisten Pilze bei Temperaturen unterhalb von  $50^\circ\text{C}$  wachsen, war es wenig überraschend, daß nur zwei Stämme isoliert wurden. Beide Stämme waren nicht in der Lage, den Copolyester zu hydrolysieren.

Die Inkubationstemperaturen aller BTA-hydrolysierenden Isolate mit Hydrolyseleistungen größer als  $0,15 \text{ mg Woche}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  und die Medien, auf denen sie kultiviert bzw. auf BTA-Hydrolyse getestet wurden, sind im Anhang in Tabelle 9.1 aufgelistet.

Somit waren mehr als 20 unterschiedliche Mikroorganismen aus Kompostproben in der Lage, den synthetischen, aliphatisch-aromatischen Copolyester BTA 40/60 zu hydrolysieren. Die Ergebnisse zeigen, daß speziell der Gruppe der thermophilen Actinomyceten bei der Kompostierung des BTA-Copolyesters eine wichtige Rolle zukommt.

#### 4.1.3 Identifizierung ausgesuchter Actinomyceten-Reinstämme

Die Isolate mit BTA-Hydrolyseleistungen von mehr als  $2 \text{ mg Woche}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ , K7a-3 und K13g, wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kroppenstedt und Mitarbeitern seines Labors in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) auf chemotaxonomische Merkmale untersucht (Kap.7.2.8). Zusätzlich wurde eine 16S rDNA-Partialsequenzanalyse von Frau Dr. C. Spröer (DSMZ, Braunschweig) durchgeführt (Kap.7.2.8.5).

Die phänotypischen Eigenschaften dieser beiden Isolate konnten nach Beschreibungen von HENSSEN (1957) und CRAWFORD (1975) denen der Gattung *Thermomonospora* zugeordnet werden. Nach einer Inkubationszeit von ca. 3 Tagen entwickelten sich auf BHI-Agar Kolonien mit durchscheinendem, leicht gelblichem Substrat- und weißem Luftmyzel. Im Luftmyzel waren einzelne Sporen erkennbar, die in Form von Clustern an der Spitze kurzer Sporophoren angeordnet waren. Die chemotaxonomischen Merkmale der beiden Isolate sind in Tabelle 4.2 denen des Stammes *Thermomonospora fusca* DSM 43792<sup>T</sup> gegenübergestellt.

Die Hydrolysate von Zellen der Stämme K13g und K7a-3 beinhalteten Glucose und Ribose als hauptsächlich vorhandene Zucker. Mesodiaminopimelinsäure war die einzige Diaminosäure, die in den Zellwänden gefunden wurde. Die polaren Lipide setzten sich zusammen aus Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin, Methylphosphatidylethanolamin und einigen unspezifischen Glykolipiden. Die Fettsäuremuster der beiden Stämme beinhalteten hauptsächlich iso- und anteiso-verzweigte Fettsäuren. Geringe Mengen von 10-Methyl-verzweigten und unverzweigten Fettsäuren wurden ebenfalls gefunden. MK-11(H4), MK-11(H6), MK-12(H4) und MK-12(H6) waren die hauptsächlich vorhandenen Menachinone beider Stämme.

Tabelle 4.2 Chemie der Zellwände und -membranen der Isolate K7a-3 und K13g im Vergleich mit dem Typenstamm *Thermomonospora fusca* DSM 43792<sup>T</sup>.

## a) Fettsäuremuster der Stämme;

Stamm	Fettsäuremuster <sup>a</sup>								Typ <sup>b</sup>
	gesättigt	unge- sättigt	Anzahl der Kohlenstoffatome					2-Hy- droxy	
			iso- 16/18	iso- 15/17	anteiso- 15/17	10-Methyl- 17	18		
K7a-3	+++	-	++	+++	+++	(+)	-	-	3e
K13g	+++	-	+++	+++	+++	-	-	-	3e
DSM 43792 <sup>c</sup>	++	(+)	+++	+++	+++	-	-	-	2d

<sup>a</sup> (+) < 5%, + 5-10%, ++ 10-15%, +++ > 15%. Die Abkürzungen für die Fettsäuren wurden nach folgendem Beispiel gebildet: iso-15: 13-Methyltetradekansäure, anteiso-15: 12-Methyldekansäure.

<sup>b</sup> nach KROPPESTEDT (1992)

<sup>c</sup> Daten aus: GREINER-MAI et al. 1987.

## b) Zucker, Phospholipide und Menachinone der Stämme.

Stamm	Diagnostische Zucker	Zucker- Typ	Phospholipide	Phospholipid- Typ	Menachinone <sup>d</sup>
					(Anzahl der Isopren- yleinheiten/ zusätzli- che Wasserstoffatome)
K7a-3	keine	C	PI, PE, PME, GL	II	11/4, 11/6, 12/4, 12/6
K13g	keine	C	PI, PE, PME, GL	II	11/4, 11/6, 12/4, 12/6
DSM 43792 <sup>e</sup>	keine	C	PI, PE, PME, GL	II	10/6, 10/8, 11/6

<sup>d</sup> Die Abkürzungen für Menachinone wurden nach folgendem Beispiel gebildet: 8/4: 2-Methyl-3-tetra-hydrooktaisoprenyl-1,4-Naphthoquinone.

<sup>e</sup> Daten aus: KROPPESTEDT und GOODFELLOW 1992.

Nach KROPPESTEDT und GOODFELLOW (1992) sind Menachinone mit langen, hoch gesättigten Isoprenylketten sowie das Vorherrschen von iso- und anteiso-verzweigten Pentadekan- und Heptadekansäuren (C<sub>15/17</sub>) charakteristisch für *Thermomonospora fusca*. Geringfügige Variationen in den Fettsäure- und Menachinonprofilen können durch unterschiedliche Wachstumstemperaturen verursacht worden sein (KROPPESTEDT et al. 1990).

Die Kombination der chemischen Marker, die in K13g und K7a-3 gefunden wurden, weist sie als Stämme der Art *Thermomonospora fusca* aus. Dieses Ergebnis wurde zudem noch durch die 16S rDNA-Partialsequenzen beider Isolate bestätigt. Sie ergab, daß beide Stämme zur Familie der *Thermomonosporaceae* gehören. Die beste Übereinstimmung wurde zwischen den Isolaten und dem Stamm *Thermomonospora fusca* DSM 43792<sup>T</sup> gefunden (K7a-3 zu 100%, K13g zu 99,8%). Somit stellen die beiden Isolate mit hoher Wahrscheinlichkeit Repräsentanten dieser Art dar.

#### 4.1.4 Bakteriophageninfektionen der Isolate

##### 4.1.4.1 Verdacht und Nachweis der Bakteriophagen von Isolat K13g

Bereits während der Isolierung der Actinomyceten wurden innerhalb der Kolonien verschiedener Isolate kleine Lyselöcher beobachtet. Solange die Hydrolyse von BTA-Filmen auf Agarplatten untersucht wurde, gab es diesbezüglich keinerlei Probleme, doch wurden bei Hydrolyseversuchen in Flüssigkulturen keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten. Dort trat in Kulturen mit dem Isolat K13g nach spätestens zwei Tagen eine massive Lyse der Biomasse auf (Bild 4.5), die auch makroskopisch sichtbar war. Dieses Phänomen der plötzlichen Lyse ist typisch für die Infektion einer Bakterienkultur mit Bakteriophagen (SCHLEGEL 1992, S. 137-147). Die Viren rufen eine völlige Umstellung des Stoffwechsels der infizierten Zellen hervor, in deren Verlauf es zur Synthese neuer Virenpartikel und einer Freisetzung derselben durch Aufbrechen der Zellen kommt. Durch dieses Aufbrechen der Zellen werden unter anderem proteolytische Zellenzyme freigesetzt, die zur Inaktivierung der zuvor in den Kulturüberstand abgegebenen Enzyme führen können.

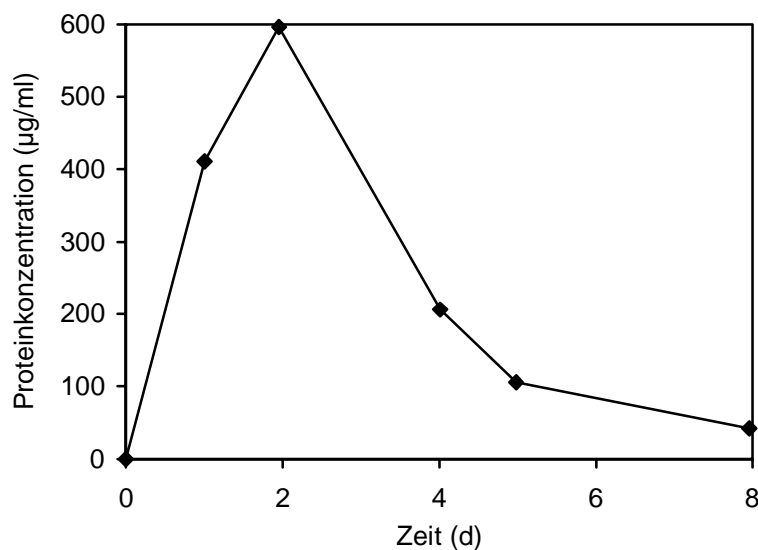


Bild 4.5

Wachstumsverlauf von *Thermomonospora fusca* K13g in flüssigem Komplexmedium (TSB) anhand von Konzentrationsmessungen intrazellulärer Proteine.

Kultur: 80 ml Medium im 300-ml-Schüttelkolben, 55°C, 120 Upm. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden je 3 Proben à 1 ml entnommen.

Eine Kontamination mit filamentösen Bakteriophagen wurde mit Hilfe der Transmissions-elektronenmikroskopie (Kap.7.2.9.4) für Stamm K13g nachgewiesen (Bild 4.6). Dadurch lassen sich die nicht-reproduzierbaren Ergebnisse der BTA-Hydrolyseversuche in Flüssigkulturen oder Enzymnachweise in Kulturüberständen erklären.

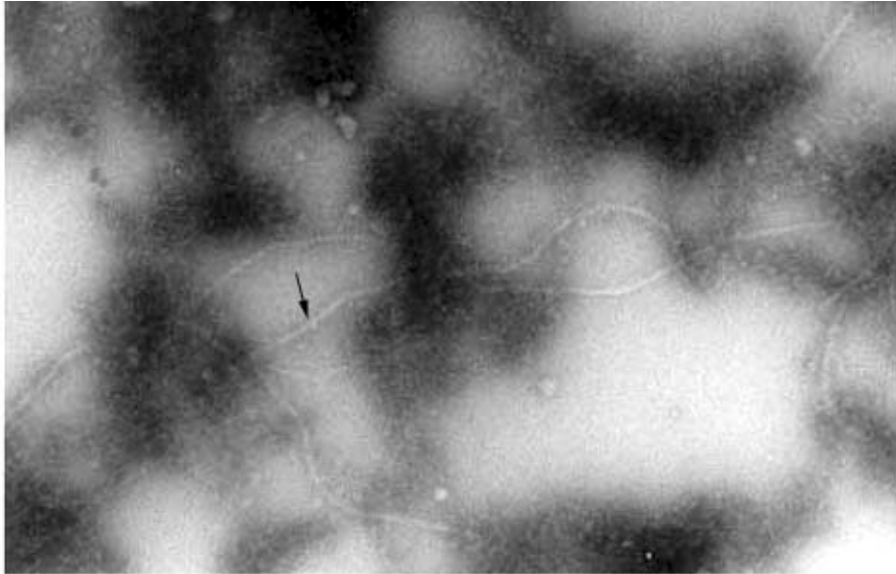


Bild 4.6 Nachweis filamentöser Bakteriophagen aus einer 7 Tage alten Flüssigkultur von *Thermomonospora fusca* K13g (Negative stain, TEM, Primärvergrößerung: 80000fach).

#### 4.1.4.2 Lösung des Bakteriophagenproblems

Nach der vollständigen Identifizierung der Isolate K7a-3 und K13g als *Thermomonospora fusca* wurden zwei Stämme dieser Art (DSM 43792<sup>T</sup>, DSM 43793) von der DSMZ, Braunschweig, erworben. Beide DSMZ-Stämme wurden in den Hydrolysetest auf Agarplatten eingesetzt. Es stellte sich heraus, daß ihre Fähigkeit zur Hydrolyse von BTA-Filmen derjenigen der Isolate K7a-3 und K13g ähnelte (Bild 4.7).

Die BTA-Filme wurden auf MSV-Agar sowohl durch die DSMZ-Stämme als auch durch die eigenen Isolate innerhalb der Testperiode von einer Woche zu mehr als 80% hydrolysiert. Auf den anderen Agarmedien wurde nur eine vergleichsweise niedrige Hydrolyse erzielt. Die Befähigung zur BTA-Hydrolyse erschien somit als eine gemeinsame Eigenschaft der getesteten Stämme der Art *Thermomonospora fusca*.



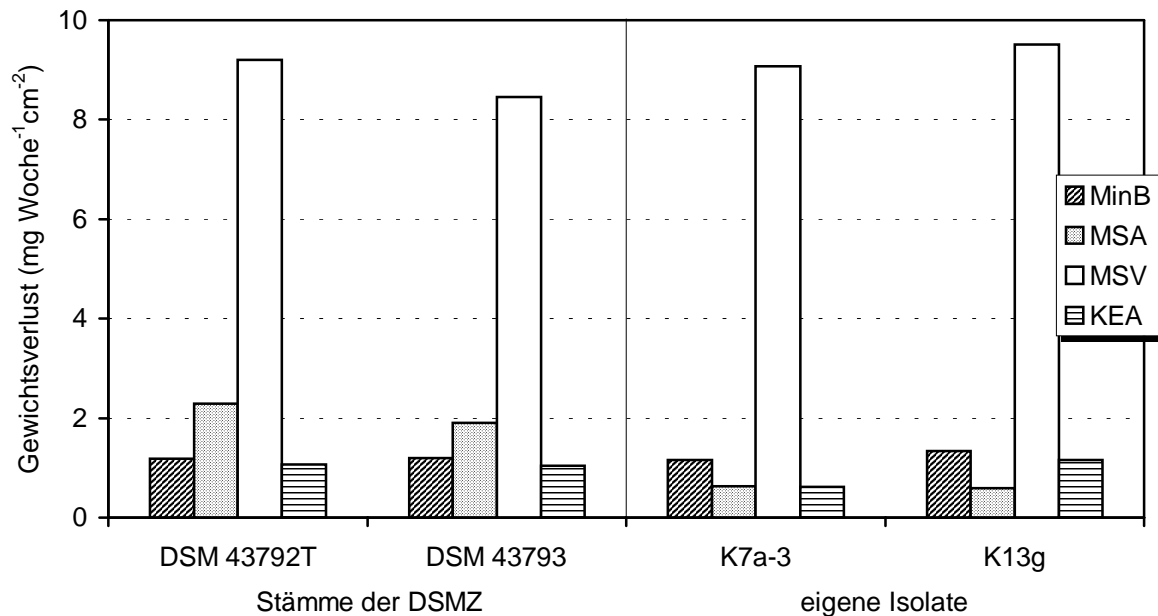


Bild 4.7 Vergleich der BTA-Hydrolyse durch vier Stämme der Art *Thermomonospora fusca* auf unterschiedlichen Agarmedien.  
Hydrolysetest mittels Agarplattenmethode (Kap.7.2.3.3): BTA-Filme (BTA 40/60,  $\varnothing = 2,5$  cm,  $m_a \approx 50$  mg,  $n = 2$ ), 7 d, 55°C.

Zur Überprüfung der DSMZ-Stämme auf mögliche Phageninfektionen wurde das Wachstum der Stämme in flüssigem Komplexmedium (TSB) beobachtet und durch Probenahme zu unterschiedlichen Zeiten mit anschließender Bestimmung des Zellproteins kontrolliert. Bei beiden DSMZ-Stämmen wurde makroskopisch keine abrupt auftretende Lyse beobachtet, wie dies bei dem phageninfizierten Isolat K13g der Fall war. Allerdings wird auch von diesen beiden Stämmen keine langandauernde stationäre Wachstumsphase erreicht (Bild 4.8). Zu beachten ist, daß Actinomyceten in Flüssigmedium mehr oder weniger als Pellets wachsen. Nach WHITAKER (1992) findet aktives Wachstum der Hyphen vorwiegend an der Oberfläche älterer Pellets statt. Mit zunehmendem Alter, häufig bereits nach 3 - 4 Tagen, kann es zur Lyse des zentralen Bereiches kommen. Dies ist makroskopisch wahrscheinlich nicht so schnell erkennbar, wie es über eine Bestimmung des Zellproteins meßbar ist.

Für weitere Untersuchungen bezüglich des BTA-hydrolysierenden Enzymsystems wurde vorwiegend *Thermomonospora fusca* DSM 43793 eingesetzt, da dieser Stamm insgesamt ein etwas schnelleres und kräftigeres Wachstum zeigte als Stamm DSM 43792<sup>T</sup>.

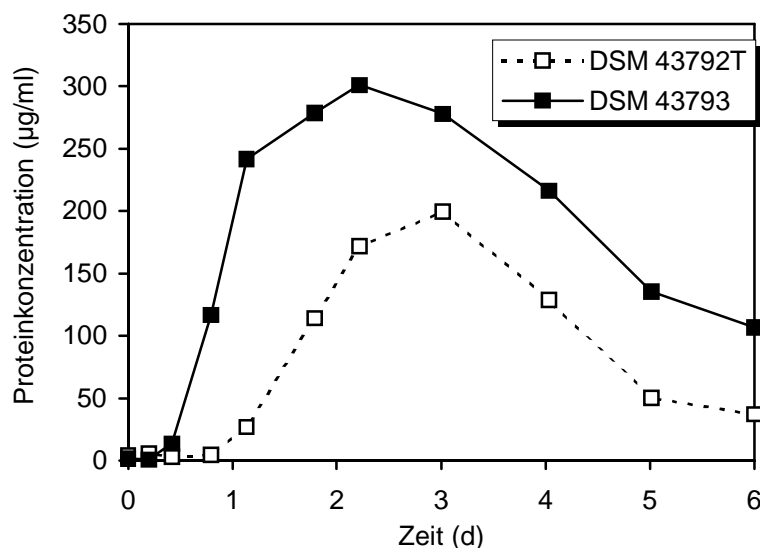


Bild 4.8

Wachstumsverlauf zweier *Thermomonospora-fusca*-Stämme in flüssigem Komplexmedium (TSB) anhand von Konzentrationsmessungen intrazellulärer Proteine.

Kultur: 80 ml Medium im 300-ml-Schüttelkolben, 55°C, 120 Upm. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden je 3 Proben à 1 ml entnommen.

#### 4.1.5 Screening der Actinomyceten-Stammsammlung der DSMZ auf BTA-Hydrolyse

Nachdem von Herrn Dr. Yamamoto (BASF, Ludwigshafen) eine stabile, homogene BTA-Dispersion zur Verfügung gestellt wurde, konnten milchig trübe BTA-Agarplatten hergestellt werden. Mit Hilfe dieser Platten war es möglich, nach der Isolierung und Identifizierung der BTA-hydrolysierenden Actinomyceten noch insgesamt 1328 Stämme der Actinomyceten-Stammsammlung der DSMZ, Braunschweig, im Labor von Herrn Dr. Kroppenstedt auf BTA-Hydrolyse zu screenen. Dies geschah durch Anzucht der Mikroorganismen auf BTA-Mineralsalzagarplatten, die mit geringen Anteilen eines Komplexmediums versetzt wurden (DSM-Screening-Medium, Kap.7.2.2.2). Verfügte ein Organismus über BTA-hydrolysierende Aktivität, so wurde diese durch die im Koloniebereich entstehenden Clear Zones erkannt, da die in das Medium abgegebenen Enzyme die BTA-Partikel in diesem Bereich „auflösten“ (Bild 4.9).

Einen Überblick über den Umfang des Screenings gibt Tabelle 4.3. Die 1328 getesteten Stämme gehören 646 verschiedenen Arten an, die wiederum 47 Gattungen zugeordnet werden. Diese Gattungen stellen Vertreter aller 8 Gruppen der Actinomyceten dar, die im „Bergey's manual of determinative bacteriology“ (HOLT et al. 1994) erwähnt werden, so daß ein weiter Bereich unterschiedlicher Actinomyceten auf BTA-Hydrolyse gescreent wurde.

Von 1328 getesteten Stämmen zeigten 175 Stämme kein Wachstum auf dem angebotenen DSM-Screening-Medium (Kap.7.2.2.2). Nur 34 der 1153 wachsenden Stämme waren zur Hydrolyse des BTA-Copolyesters fähig. Dieses Ergebnis zeigt, daß die BTA-hydrolysierenden Enzyme innerhalb der Gruppe der Actinomyceten nicht sehr weit verbreitet sind. Unterscheidet man bei den 34 BTA-hydrolysierenden Stämmen zwischen mesophilen (20-45°C) und thermophilen (>45°C) Organismen, so ist festzustellen, daß ein erheblich größerer

Prozentsatz der thermophilen Stämme zur Hydrolyse des BTA-Copolyesters fähig ist. Nur 87 der 1153 wachsenden Stämme waren thermophil, doch zeigten von diesen Stämmen 19,5% die Fähigkeit zur BTA-Hydrolyse im Gegensatz zu 1,6% der mesophilen Stämme.

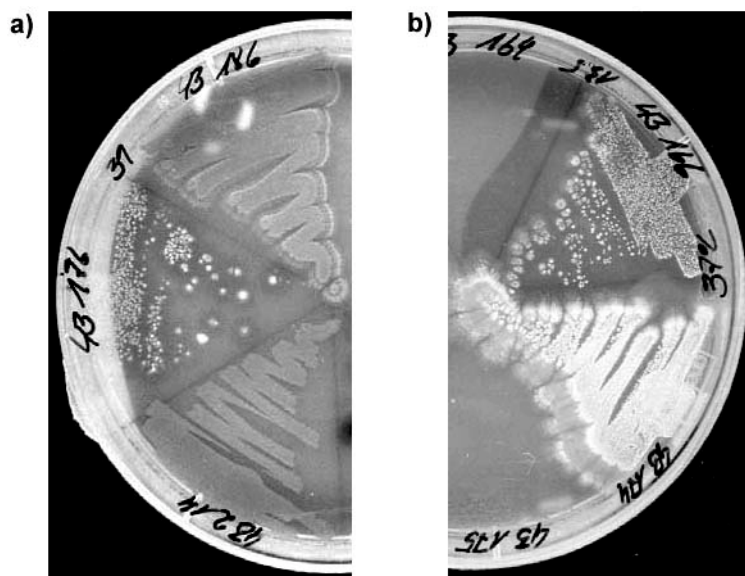


Bild 4.9 Bildung von Clear Zones durch BTA-hydrolysierende Stämme (DSM 43176 und DSM 43166) auf DSM-Screening-Medium.  
a) Clear Zones nur in Kolonieu Umgebung: +, b) weitflächige Clear Zone aufgrund starker Produktion hydrolysierender Enzyme: +++.

Tabelle 4.3 Schematische Übersicht über das Screening der Actinomyceten-Stammsammlung der DSMZ.

Σ getesteter Gattungen:	47	
Σ getesteter Arten:	646	
Σ getesteter Stämme:	<b>1328</b>	
➔ kein Wachstum:	175	
➔ Wachstum:	1153	} davon BTA-Hydrolyse: 34
➔ mesophil:	1066	} - " - : 17 (1,6%)
➔ thermophil:	87	} - " - : 17 (19,5%)

Diejenigen Arten, die in der Lage waren, den BTA-Copolyester zu spalten, sind in Tabelle 4.4 zusammengestellt (eine Liste aller getesteten Stämme ist in Tabelle 9.2 im Anhang enthalten). Auffällig ist, daß unterschiedliche Stämme derselben Art oft sehr ähnliche BTA-Hydrolyseleistungen zeigten: *Saccharopolyspora rectivirgula* (4 positive von 4 getesteten Stämmen), *Microbispora rosea rosea* und *Microbispora rosea aerata* (3/3), *Thermomonospora fusca* (2/2 bzw. 4/4, wenn die Isolate K7a-3 und K13g noch berücksichtigt werden). Im Falle von *Thermomonospora fusca* zeigten die beiden DSM-Stämme und die beiden Isolate in Hydrolyseversuchen mit BTA-Filmen auf Agarplatten das gleiche Verhalten auf

den unterschiedlichen Medien: sehr gute Hydrolyse auf MSV, mäßige bis schlechte Hydrolyse auf den anderen drei Medien (Bild 4.7).

Unterschiedliche Ergebnisse bei Stämmen einer Art traten bei *Amycolatopsis mediterranei* (1/2), *Saccharomonas viridis* (3/4), *Thermoactinomyces vulgaris* (1/7) und bei *Thermobifida fusca* (1/2) auf. Weiterhin ist zu beachten, daß es sich bei den Bezeichnungen *Rhodococcus* sp., *Saccharomonas* sp. und *Thermoactinomyces* sp. um verschiedene Arten derselben Gattung handelt, so daß hier Unterschiede in den Ergebnissen der BTA-Hydrolyse nicht hinsichtlich der Hydrolyseleistungen einer Art bewertet werden dürfen.

Tabelle 4.4 BTA-hydrolysierende Arten der Actinomyceten-Stammsammlung der DSMZ.

Art	DSM-Nummer	Temperatur (°C)	n <sup>a</sup>	BTA-Hydrolyse <sup>b</sup>
<i>Actinomadura atramentaria</i>	43919	28	1 / 1	+++
<i>Actinoplanes humidus</i>	43938	28	1 / 1	+
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	43304	28	1 / 2	+++
<i>Microbispora rosea aerata</i>	43166, 43176	37	2 / 2	+++ / +
<i>Microbispora rosea rosea</i>	43838	28	1 / 1	+
<i>Rhodococcus</i> sp.	43976	28	1 / 17	+
<i>Saccharomonospora</i> sp.	44088, 44091, 44092	45	3 / 5	+
<i>Saccharomonospora caesia</i>	43680	28	1 / 1	+
<i>Saccharomonospora viridis</i>	43017, 43018, 43754	45	3 / 4	++
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	43755	45	1 / 1	+++
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	43113, 43114, 43747	55	3 / 3	++
<i>Streptomyces</i> sp.	43683	20	1 / 1	+
<i>Streptomyces aureocirculatus</i>	40386	28	1 / 1	++
<i>Streptomyces fimicarius</i>	40322	28	1 / 1	+++
<i>Streptomyces paradoxus</i>	43350	28	1 / 1	++
<i>Streptomyces setonii</i>	40395	28	1 / 1	+++
<i>Thermoactinomyces</i> sp.	43370, 43774	50	2 / 5	+++ / +
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	43785	50	1 / 7	+
<i>Thermobifida fusca</i>	44341	55	1 / 2	++
<i>Thermomonospora</i> sp.	43773	50	1 / 1	+++
<i>Thermomonospora alba</i>	43795	37	1 / 1	+
<i>Thermomonospora curvata</i>	43183	45	1 / 1	+
<i>Thermomonospora fusca</i>	43792 <sup>T</sup> , 43793	50	2 / 2	+++
nicht identifiziert	43920	28	1 / 1	+++
nicht identifiziert	43921	28	1 / 1	+

<sup>a</sup> n = Anzahl positiver Stämme / von Anzahl getesteter Stämme derselben Art (und Temperatur).

<sup>b</sup> Beurteilung der BTA-Hydrolyse siehe Bild 4.9.

Die Fähigkeit, den BTA-Copolyester zu spalten, ist auf keine bestimmte Gruppe der Actinomyceten beschränkt, sofern man nach der Einteilung nach „Bergey's manual of determinative bacteriology“ (HOLT et al. 1994) geht. Die Wahrscheinlichkeit, diese Fähigkeit zur BTA-Hydrolyse bei thermophilen Actinomyceten zu finden, ist jedoch deutlich höher als bei den mesophilen Organismen. Somit wurden die Ergebnisse der Isolierung BTA-hydrolysierender Organismen aus Kompost bestätigt. Die Fähigkeit zur BTA-Hydrolyse ist zumindest tendenziell allen Stämmen einer Art gemeinsam, womit die Wahrscheinlichkeit hoch ist, das codierende Gen auf dem Bakterienchromosom und nicht auf Plasmiden zu finden.

## 4.2 Charakterisierung des Abbauverhaltens ausgesuchter Stämme

### 4.2.1 Vorbemerkung

Nachdem mit den zuvor beschriebenen thermophilen Actinomyceten potentiell BTA-abbauende Organismen zur Verfügung standen, wurden verschiedene Untersuchungen zum biologischen Abbau des aliphatisch-aromatischen Copolyesters mit den *Thermomonospora fusca*-Stämmen durchgeführt. Ziel dieser Arbeiten war es, einerseits Informationen über die Randbedingungen des BTA-Abbaus zu erhalten, andererseits im Hinblick auf die Isolierung der hydrolysierenden Enzyme die Kultivierungsbedingungen bezüglich der Enzymproduktion zu optimieren.

Die Versuche wurden sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigkulturen durchgeführt. Während in flüssigen Medien anfänglich Probleme bezüglich der Reproduzierbarkeit bestanden, erwiesen sich die Agarplattentests als einfach durchführbare und reproduzierbare Versuche.

### 4.2.2 Polyesterspaltung auf Agarplatten

#### 4.2.2.1 Aufnahme von Hydrolysekurven mit *Thermomonospora fusca* K13g

In den Agarplattentests, die zur Verifizierung der BTA-Hydrolyse während der Isolierungsversuche durchgeführt wurden, erfolgte die Bestimmung des Gewichtsverlustes der BTA-Filme jeweils nach einer fixen Testdauer von 14 Tagen. In Bild 4.10 ist die Hydrolyse von BTA-Filmen auf Agarplatten durch den Stamm K13g über einen Versuchszeitraum von 14 Tagen dargestellt. BTA-Filme wurden hierfür auf MSV-Agar mit einer Sporensuspension von *Thermomonospora fusca* K13g beimpft. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden die Gewichtsverluste von je drei Polymerfilmen bestimmt.

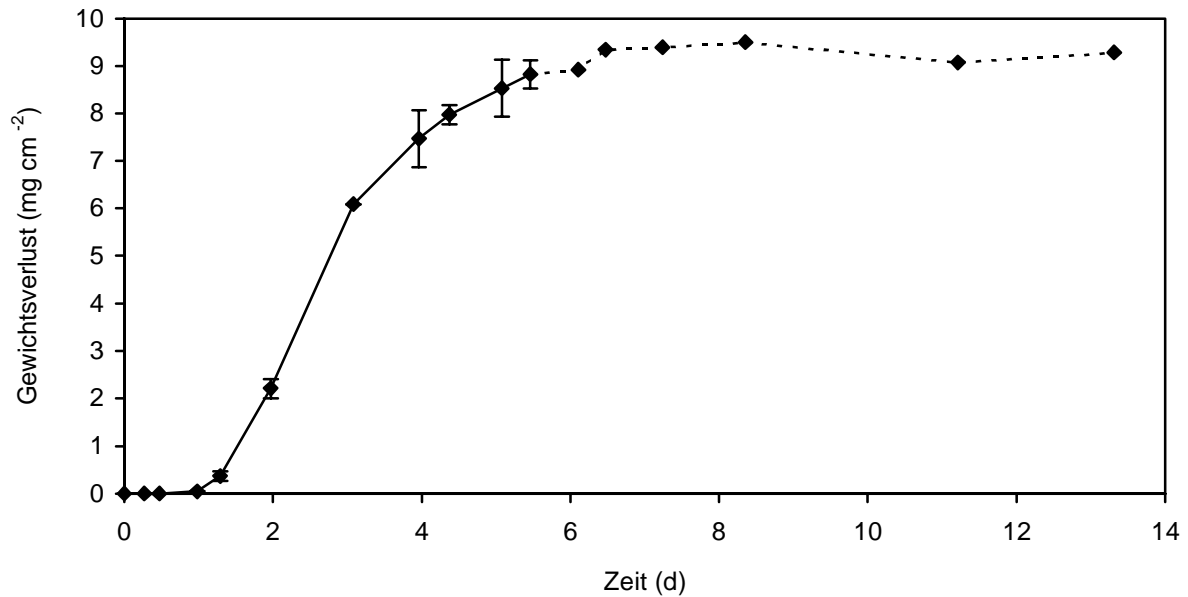


Bild 4.10 Zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von BTA-Filmen auf MSV-Agarplatten durch *Thermomonospora fusca* K13g.

Vom sechsten Tag an wurde auf die Darstellung von Fehlerbalken verzichtet, da die BTA-Filme (BTA 40/60,  $\varnothing = 2,5$  cm,  $m_a \approx 45$  mg,  $n = 3$ ) entsprechend ihrer Ausgangsgewichte verschwanden (leichte Filme zuerst) und Fehlerbalken lediglich die unterschiedlichen Ausgangsgewichte wiedergegeben hätten.

Während einer eintägigen lag-Phase keimten die Sporen aus. In den darauffolgenden drei Tagen verlief die Hydrolyse der BTA-Filme mit relativ konstanter Geschwindigkeit. Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch war eine Rißbildung innerhalb der BTA-Filme zu beobachten, die eng mit dem Wachstum der Organismen korrelierte: Überall dort, wo sich zuerst Koloniewachstum zeigte, traten die ersten Risse auf (Bild 4.11 und Bild 4.12).

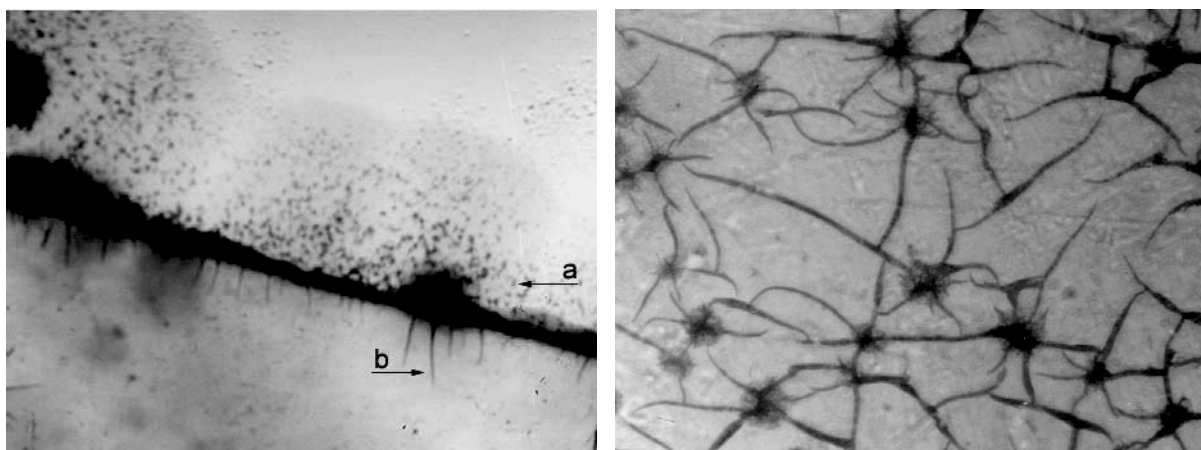


Bild 4.11 Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit *Thermomonospora fusca* K13g bewachsenen BTA-Filmen auf MSV-Agar (Durchlichtmikroskopie, Primärvergrößerung: 25fach). Links: Kultur nach 24 h, a Kolonie am Rand eines BTA-Filmes, b beginnende Rißbildung im BTA-Film in Nähe der Kolonie; rechts: Kultur nach 48 h, sternförmige Rißbildung innerhalb eines BTA-Filmes ausgehend von Kolonien, die unterhalb des Filmes wachsen.

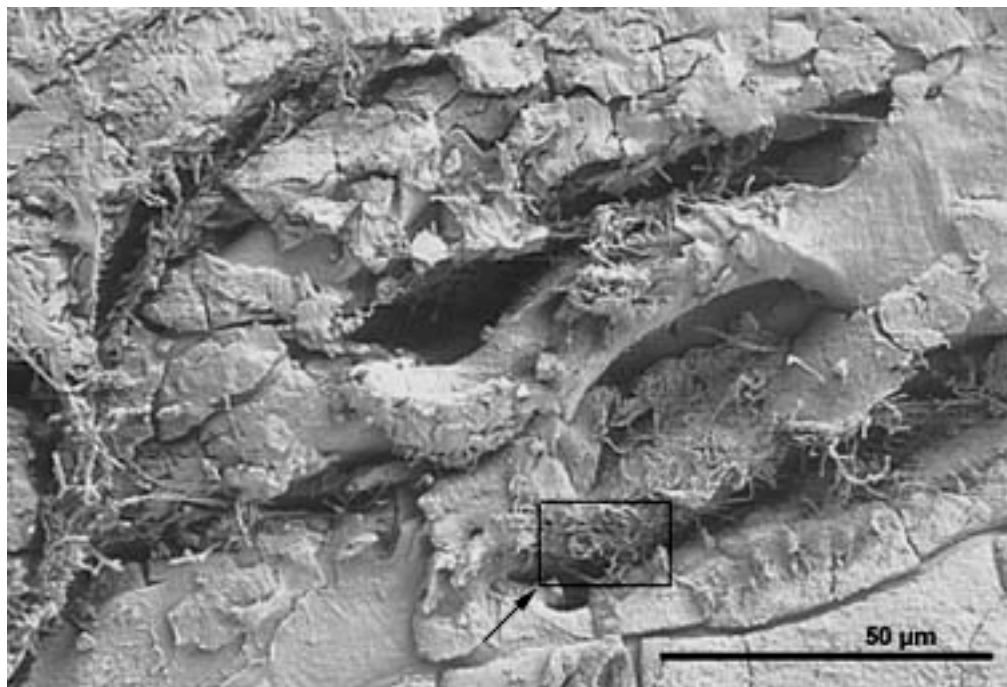
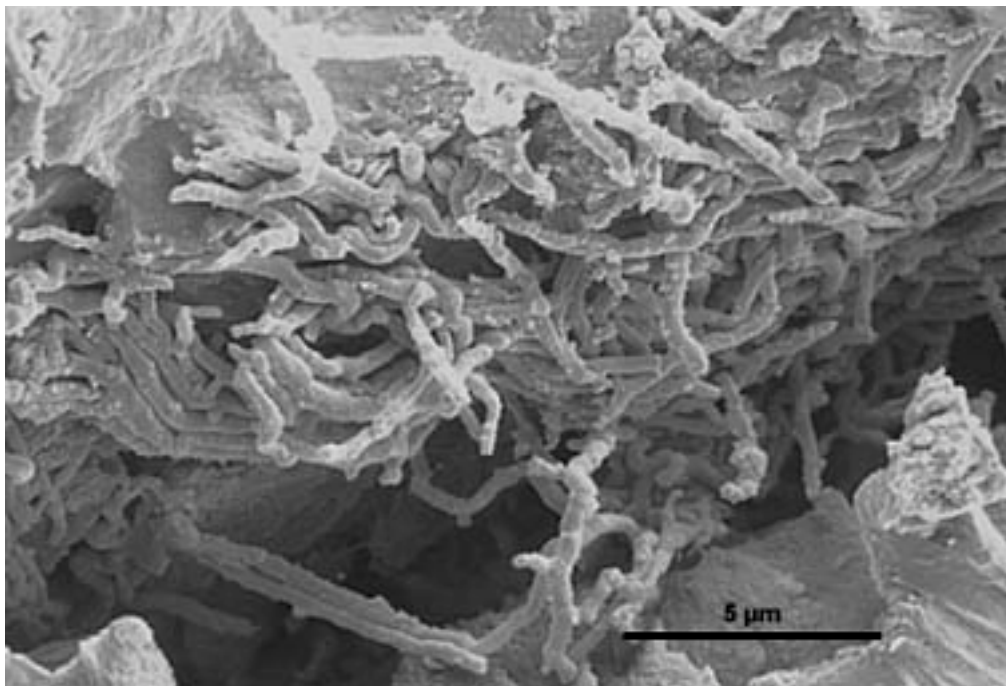
**a****b**

Bild 4.12 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von einem mit *Thermomonospora fusca* K13g bewachsenen BTA-Film.  
a Besiedelung der Polymeroberfläche durch myzelartige Zellen von K13g im Bereich eines Risses, b Ausschnittvergrößerung von a.

Am zweiten Tag war diese Rißbildung so weit fortgeschritten, daß die Filme mosaikartig aussahen. Sobald die BTA-Filme in Fragmente zerfielen, sank die Geschwindigkeit der Hydrolyse. Ab dem fünften Tag waren nur noch wenige Fragmente erkennbar. Bei unimpften Kontrollfilmen wurde keine Rißbildung beobachtet.

Die Bestimmung des Gewichtsverlustes von BTA-Filmen zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit aus, wie an den zumeist sehr kleinen Fehlerbalken in Bild 4.10 erkenn-

bar ist. Der lineare Bereich einer solchen Hydrolysekurve kann für die Definition einer spezifischen Hydrolyserate genutzt und als Aktivitätsmaß, z.B. für vergleichende Untersuchungen unterschiedlicher Organismen oder Testsysteme, herangezogen werden.

#### 4.2.2.2 Gegenüberstellung von Kompostsimulierung und Hydrolysetest auf Agarplatten

Aus dem linearen Verlauf der in Kap. 4.2.2.1 beschriebenen Hydrolysekurven können spezifische Hydrolyseraten berechnet werden. Wird zudem die Oberfläche der Polymerfilme berücksichtigt, die von den Mikroorganismen angegriffen werden kann, so können unterschiedliche Experimente im Hinblick auf die Hydrolyseleistungen der beteiligten Mikroorganismen miteinander verglichen werden. Ein derartiger Vergleich ist in Bild 4.13 dargestellt.

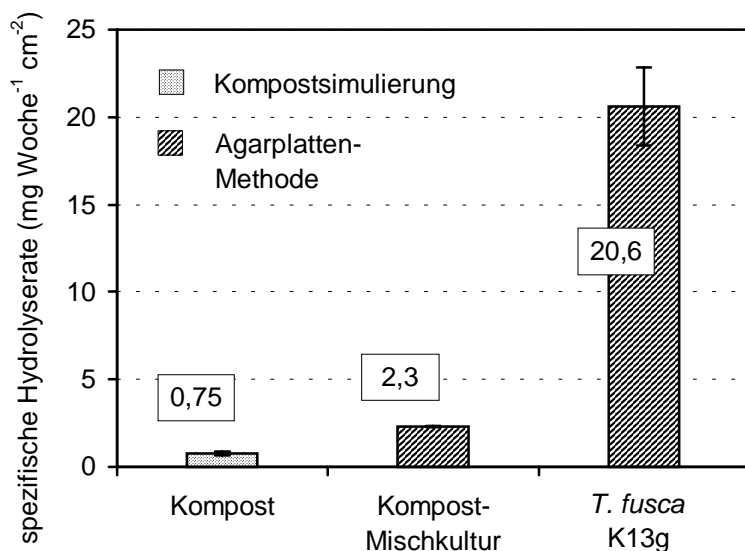


Bild 4.13

Vergleich der Hydrolyseraten bei Einsatz unterschiedlicher Testsysteme.

Die spezifischen Hydrolyseraten einer Kompostsimulierung in Kompostreaktoren wurden mit denen zweier Agarplattentests verglichen, der eine beimpft mit einer Kompostpopulation, die durch Herstellung einer Suspension aus frischem Kompost gewonnen wurde, der andere beimpft mit einer Reinkultur von *Thermomonospora fusca* K13g.

Bei Vergleich der Kompostsimulierung mit dem mit einer Kompost-Mischkultur beimpften Agarplattentest läßt sich die höhere Hydrolyserate, die mit dem letzteren erreicht wurde, durch verbesserte Umgebungsbedingungen auf den Agarplatten erklären (Kontakt zwischen Mikroorganismen und Polymerfilmen, Sauerstoffversorgung, Wassergehalt).

Für die Hydrolyse von BTA-Filmen auf Agarplatten durch den Stamm *Thermomonospora fusca* K13g wurden bemerkenswerte Hydrolyseraten von 20 mg Woche<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> erreicht. Dies sind ca. zehnfach höhere Werte als sie mit der Kompost-Mischkultur auf Agarplatten beobachtet wurden, was wahrscheinlich auf den fehlenden Konkurrenzdruck in der Reinkultur zurückführbar ist.



Der Anstieg der spezifischen Hydrolyserate von der Kompostsimulierung hin zur Agarplattenmethode mit dem Reinstamm ist demnach sowohl durch höhere Hydrolyseleistungen der Organismen als auch durch verbesserte Umgebungsbedingungen, die den Mikroorganismen auf den Agarplatten geboten werden, zu erklären.

#### 4.2.2.3 Spaltung verschiedener Polyesterstrukturen durch *Thermomonospora fusca* K7a-3 und K13g

Der aliphatisch-aromatische Copolyester BTA 40/60 ist ein bioabbaubarer Kunststoff, der nicht in der Natur vorkommt. Um das Spektrum der von *Thermomonospora fusca* K13g und K7a-3 hydrolysierbarer Polyesterstrukturen zu untersuchen, wurden weitere synthetische und natürliche Polyester und ein Polyesteramid in den Hydrolysetest auf Agarplatten eingesetzt. Die Strukturen der verschiedenen Polymere sind in Bild 4.14 dargestellt.

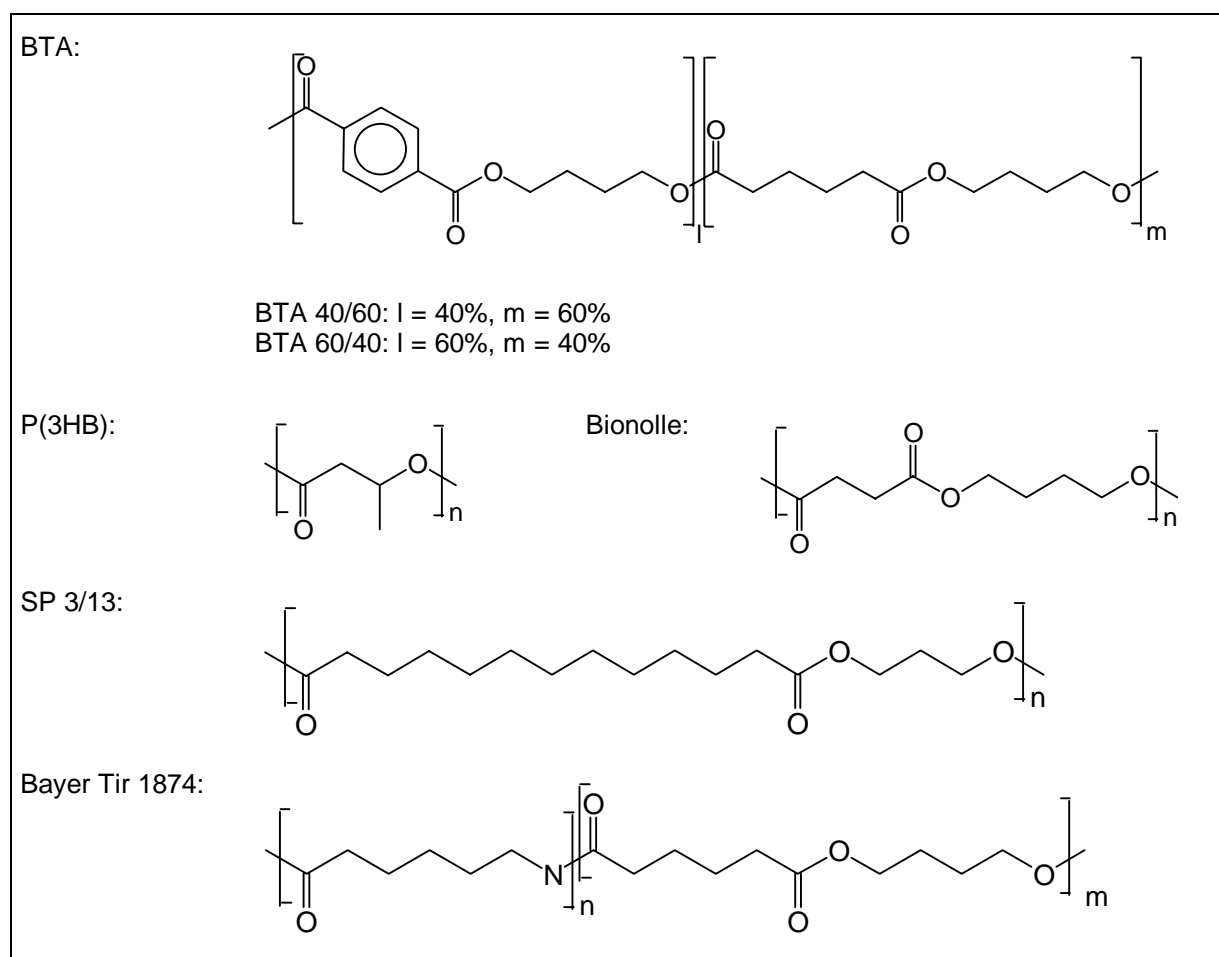


Bild 4.14 Strukturformeln der getesteten Polymere.

Alle den Organismen angebotenen Polymere wurden eindeutig angegriffen (Bild 4.15). Beide Stämme, K7a-3 und K13g, wiesen ein identisches Muster hinsichtlich der Hydrolyseleistungen gegenüber den unterschiedlichen Polymeren auf. Isolat K7a-3 zeigte

etwas niedrigere Hydrolysegeschwindigkeiten, was unter Umständen durch geringfügige Unterschiede in den Sporenkonzentrationen der Inokula bedingt wurde, die auf ca.  $10^7$  KBE/ml eingestellt wurden.

Von allen getesteten Materialien wurde der aliphatisch-aromatische Copolyester BTA 40/60 am schnellsten hydrolysiert. Rein aliphatische Materialien wie Bionolle, Bayer Tir 1874 oder der natürlich vorkommende, bakterielle Polyester Polyhydroxybuttersäure (P(3HB)) wurden deutlich langsamer hydrolysiert als der Copolyester BTA 60/40, dessen Säurekomponenten zu 60 mol% aus der aromatischen Terephthalsäure besteht. Dies überrascht, da aliphatische Polyester im Gegensatz zu Polyestern mit aromatischen Komponenten als relativ leicht biologisch abbaubar eingestuft werden (HUANG 1989, KAWAI 1995). Demgegenüber wurde der aliphatische Polyester SP 3/13, der aufgrund seiner sehr langen Dicarbonsäure (Brassylsäure) stark hydrophobe Eigenschaften besitzt, im gleichen Maße von den beiden Teststämmen hydrolysiert wie der Copolyester BTA 60/40. In Erdeingrabetests (12 Wochen) und enzymatischen Untersuchungen (24 h) zeigten SP 3/13-Filme nur Gewichtsverluste von weniger als 1% (PETERS 1995).

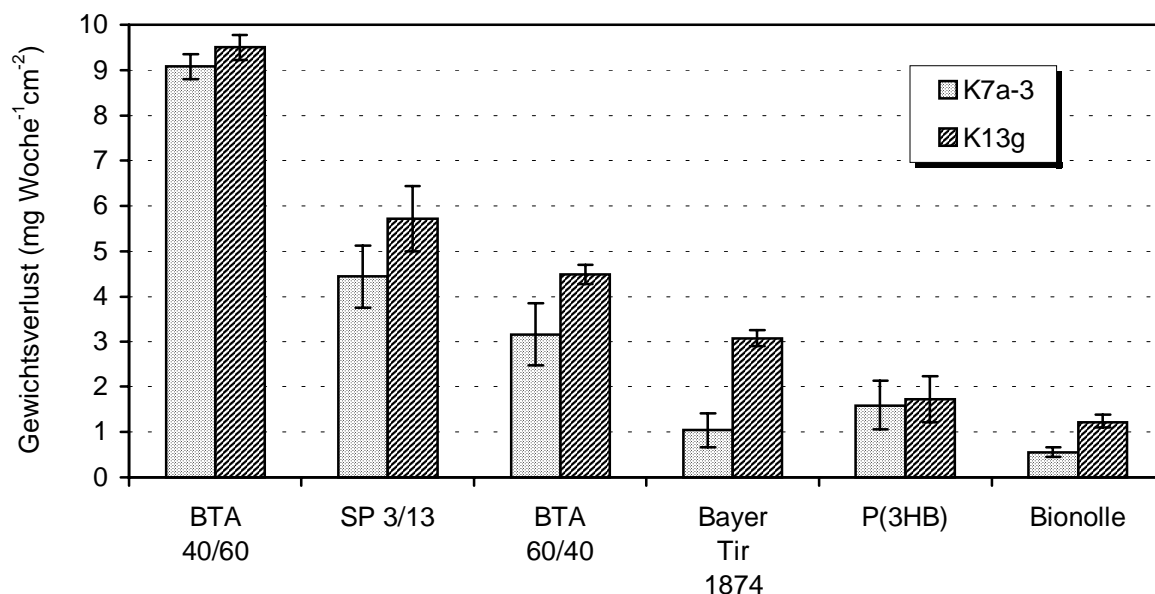


Bild 4.15 Spaltung verschiedener Polyester- und Polyesteramid-Filme auf MSV-Agarplatten durch *Thermomonospora fusca* K13g und K7a-3. Hydrolysetest (Kap.7.2.3.3.): Polymerfilme ( $\varnothing = 2,5$  cm,  $n = 3$ ), 14 d, 55°C.

Die Versuchsergebnisse beschreiben die Fähigkeit der beiden Isolate K7a-3 und K13g, sich in ihrer Struktur ähnelnde Polymere spalten zu können. Es wird vermutet, daß die Mikroorganismen hydrophobe Oberflächen bevorzugen, wie sie von den aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyestern oder SP 3/13 geboten werden. Ob es sich bei den polymerspaltenden

Enzymen um ein und dasselbe recht unspezifische Enzym oder um unterschiedliche spezifische Enzyme handelt, läßt sich anhand dieses Versuches nicht feststellen.

#### 4.2.2.4 Einfluß der Temperatur auf die BTA-Hydrolyse

Die Bestimmung der optimalen Temperatur der BTA-Hydrolyse erfolgte auf MSV-Agarplatten mit *Thermomonospora fusca* K13g (Bild 4.16). Im Temperaturbereich von 37 bis 65°C waren Gewichtsverluste von BTA-Filmen meßbar. Dies entspricht dem Wachstumsbereich des Stammes K13g, der bei ca. 55°C ein Wachstumsoptimum aufwies (Tabelle 9.1, Anhang). Signifikante Ergebnisse der BTA-Hydrolyse waren auf den Bereich zwischen 40 und 60°C beschränkt; das Maximum wurde bei 60°C erreicht. Die Differenz zwischen dem Optimum des Wachstums und dem der Hydrolyse läßt sich mit dem Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität erklären. Nach STELLMACH et al. (1988, S. 3) wächst die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion bei Erhöhung der Temperatur um 10°C auf das zwei- bis vierfache an. Das starke Absinken der BTA-Hydrolyse bei 65°C läßt sich durch das gleichfalls stark verminderte Wachstum bei dieser Temperatur und der dadurch wahrscheinlich nur geringen Produktion BTA-hydrolysierender Enzyme erklären.

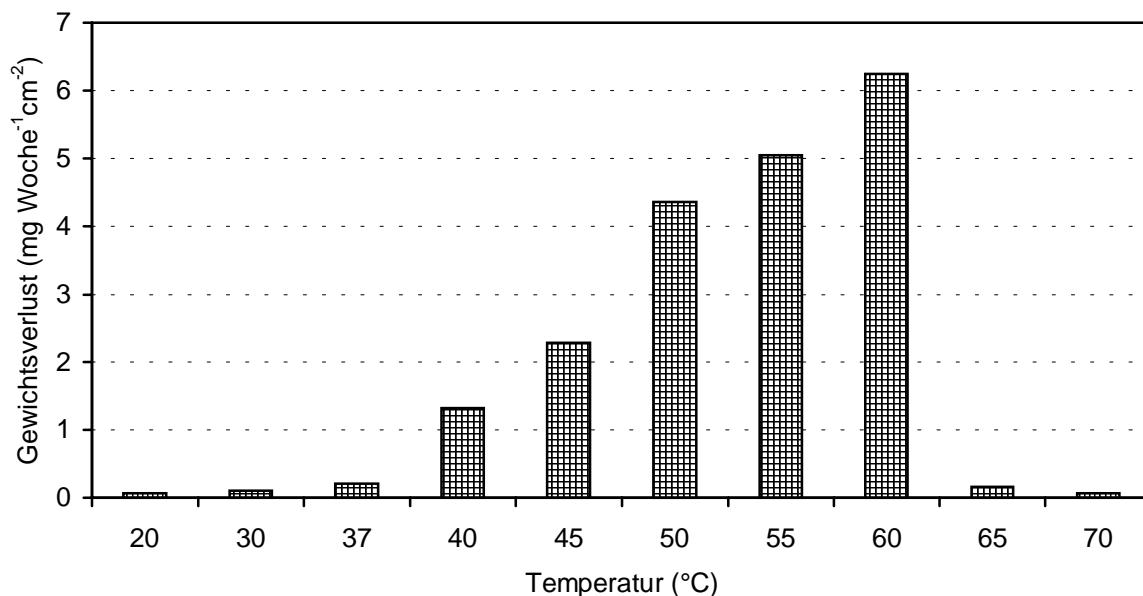


Bild 4.16 Hydrolyse von BTA-Filmen auf MSV-Agarplatten durch *Thermomonospora fusca* K13g in Abhängigkeit von der Temperatur.  
Testansatz: BTA-Filme (BTA 40/60,  $\varnothing = 2,5$  cm,  $m_a = 100 \pm 5$  mg,  $n = 2$ ), MSV-Agar, 7 d.

Mit dem Stamm DSM 43793, der zur Produktion BTA-hydrolysierender Enzyme im Zuge der Enzymreinigung zum Einsatz kam, wurde die Bestimmung des Temperaturoptimums in Flüssigkultur nicht wiederholt. Da das Temperaturoptimum für das Wachstum dieses Stam-

mes im DSMZ-KATALOG (1993) mit 50°C angegeben war, wurde die sonst für die BTA-Hydrolyse übliche Inkubationstemperatur von 55°C beibehalten.

### 4.2.3 Polyesterspaltung in Flüssigkultur

#### 4.2.3.1 Optimierung des Beimpfungsmodus

##### Herstellung des Inokulums

Die Actinomyceten wurden als Sporensuspensionen über mehrere Monate bei 4°C konserviert. Auf diese Weise war die Gefahr gering, durch häufiges Überimpfen Mutanten anzuzüchten, die möglicherweise gewünschte Eigenschaften des Organismus verloren hätten. Diese Sporensuspensionen wurden direkt als Impfmateriel zum Testen der BTA-Hydrolyse auf Agarplatten eingesetzt.

Für Untersuchungen der BTA-Hydrolyse in Flüssigkulturen war es dagegen notwendig, zunächst vegetative Zellen in Schüttelröhrchen mit Komplexmedium als Inokulum anzuzüchten, da aufgrund des in Flüssigkultur inhomogenen Auskeimens der Sporen keine reproduzierbaren Ergebnisse in mit Sporensuspensionen beimpften Hydrolyseversuchen erhalten wurden. Die Varianten reichten dabei von keinem Wachstum über homogenes Wachstum bis hin zu Wachstum als Myzelpellets in jeder Übergangsstufe. Solche Phänomene sind für myzelartig wachsende Organismen allgemein bekannt. In einem Übersichtsartikel beschreibt WHITAKER (1992) das pelletartige Wachstum von Actinomyceten in Flüssigkulturen. Es wird unter anderem beeinflusst durch die Art des Actinomyceten, die Sporenkonzentration des Inokulums, das Medium und die Verfügbarkeit von Sauerstoff.

Durch Vorkultivierung der Actinomyceten in Kulturröhrchen mit 5 ml TSB-Medium (Kap.7.2.4) und durch Einsatz von variabel in ihrer Schräglage verstellbaren Reagenzglasaltern konnte diesem inhomogenen Wachstum entgegengewirkt werden. Durch die schrägere Lage der Kulturröhrchen wurde die Flüssigkeitsoberfläche vergrößert und die Flüssigkeitstiefe verringert, wodurch der Sauerstoffeintrag erhöht werden konnte. Die größere Biomasseproduktion und die geringeren Standardabweichungen von in starker Schräglage geschüttelten Röhrchen (Bild 4.17) sind Indizien für verbesserte Bedingungen des Auskeimens der Actinosporen.

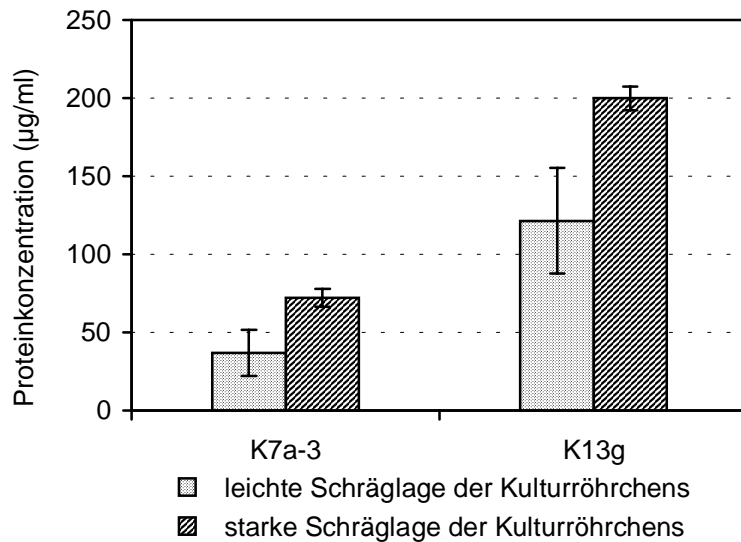


Bild 4.17

Einfluß der Sauerstoffversorgung auf das Wachstum von *Thermomonospora fusca* K7a-3 und K13g.

Anzucht der Stämme in Kulturröhrchen (TSB-Medium, 24 h, 55°C), Konzentrationsbestimmung intrazellulärer Proteine.

Entstanden dennoch Myzelpellets in der Vorkultur, wurden diese vor der Beimpfung von Parallelen eines Versuchsansatzes mit Hilfe eines Scherspalthomogenisators (Ultraturrax) zerteilt. Die Behandlung konnte bei einer Scherkopfgröße von 7 mm und einem Kulturvolumen von ca. 5 ml bei 8000 Upm und bis zu 60 Sekunden Dauer durchgeführt werden, ohne daß dadurch größere Schädigungen der Biomasse verursacht wurden. In Bild 4.18 sind die Auswirkungen bei Variation der Dauer sowie der Intensität der Ultraturrax-Behandlung einer Vorkultur (Kap.7.2.4) von *Thermomonospora fusca* K13g auf das Wachstum nachfolgender Kulturen dargestellt. Je intensiver die Behandlung der Vorkultur, um so massiver war die Schädigung des Myzels und um so schlechter war das Wachstum in mit derartig behandelten Vorkulturen beimpften Hauptkulturen.

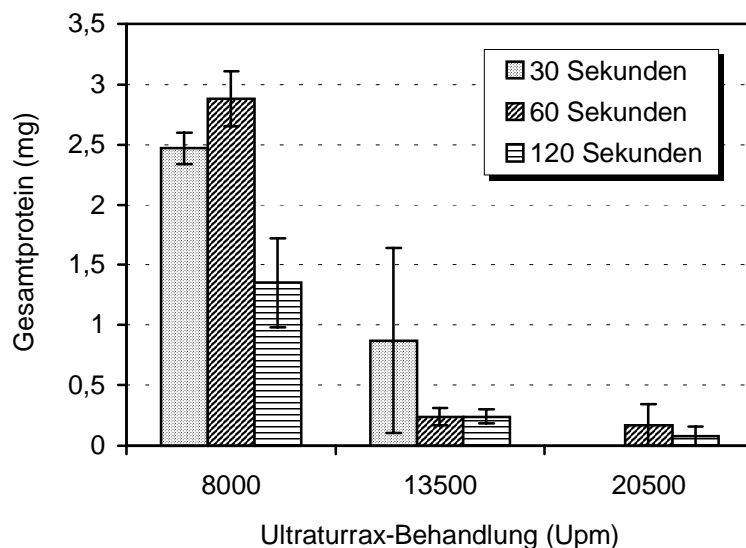


Bild 4.18

Auswirkungen unterschiedlicher Ultraturrax-Behandlungen auf das weitere Wachstum von *Thermomonospora fusca* K13g.

Kultur (n = 4): Kulturröhrchen à 5 ml TSB-Medium beimpft mit je 200 µl einer homogenisierten Vorkultur (weitere Erklärungen siehe Text), 24 h, 55°C; Bestimmung des Gehaltes an Gesamtprotein.

#### Untersuchung verschiedener Streßfaktoren

Ein weiteres Problem bei der Beimpfung von Flüssigkulturen trat mit dem Wechsel des Vorkulturmediums (Komplexmedium TSB zur Produktion von Biomasse) zu dem der Haupt-

kultur (Mineralsalzmedium MSV) auf. Derselbe Actinomyceten-Stamm zeigte in demselben Mineralsalzmedium bei zu unterschiedlichen Zeiten beimpften Testreihen Variationen der Gewichtsverluste des BTA-Copolyesters um bis zu 80%. Es lag nahe, die Ursachen hierfür in der Art des Beimpfens zu suchen.

Um dem Mineralsalzmedium beim Beimpfen keine weiteren Energie- und Kohlenstoffquellen außer dem BTA-Copolyester hinzuzufügen, wurde die Biomasse der Vorkultur durch Abzentrifugieren aus dem Komplexmedium und anschließendes Resuspendieren in Phosphatpuffer gewaschen. Es wurde vermutet, daß das Waschen, die Ultraturrax-Behandlung und die Umstellung auf das neue Nährmedium innerhalb kurzer Zeit ein Absterben der Biomasse verursachte.

Zur systematischen Untersuchung verschiedener Beimpfungsverfahren wurden aus einer Vorkultur von *Thermomonospora fusca* DSM 43793 vier verschiedene Inokula hergestellt. Einerseits wurde mit in Phosphatpuffer gewaschener Biomasse und andererseits direkt mit der Vorkultur beimpft, obwohl damit zusätzliche Energie- und Kohlenstoffquellen ins Mineralsalzmedium gelangten. Weiterhin wurde die eine Hälfte der Inokula mittels Ultraturrax homogenisiert. Bei allen vier Varianten wurde mit zwei Animpfkonzentrationen (0,85 oder 1,7 mg Biomasse) gearbeitet und es wurden jeweils 4 parallele Kulturkolben mit je einem BTA-Film in 35 ml MSV-Medium beimpft.

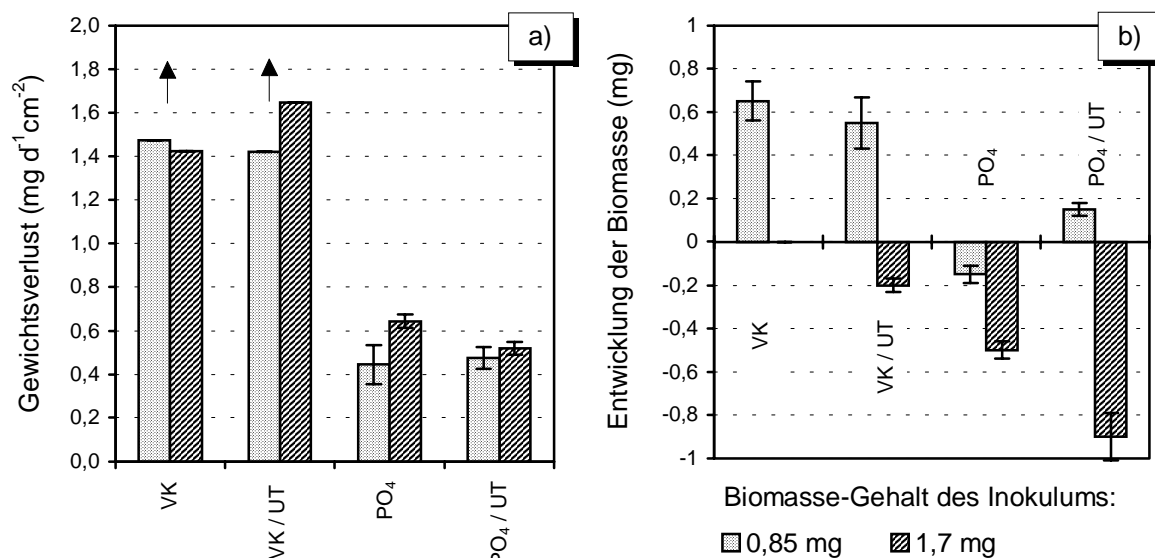


Bild 4.19 Einfluß verschiedener Streißfaktoren auf die BTA-Hydrolyse und die Biomasseentwicklung von *Thermomonospora fusca* DSM 43793 in flüssigem MSV-Medium.  
a) Gewichtsverlust von BTA-Filmen (BTA 40/60,  $\varnothing = 2,5$  cm,  $m_a = 40-55$  mg,  $n = 4$ ), Pfeile: 100%ige Hydrolyse der Filme innerhalb von 3 Tagen;  
b) Biomasseentwicklung in der Hauptkultur.

VK: beimpft mit Vorkultur in flüssigem TSB-Medium, PO<sub>4</sub>: beimpft mit in Phosphatpuffer gewaschener Biomasse der Vorkultur, UT: Homogenisieren der Inokula mittels Ultraturrax (8000 Upm, 10 s).

Alle direkt mit der Vorkultur beimpften Proben zeigten eine 100%ige Hydrolyse der BTA-Filme innerhalb von drei Tagen. Die mit in Phosphatpuffer gewaschener Biomasse beimpften Kulturen erreichten hingegen nur einen Gewichtsverlust der BTA-Filme von ca. 15 mg, d.h. ein um mehr als 50% niedrigeres Ergebnis (Bild 4.19a). Die Behandlung mit dem Ultraturrax hatte offensichtlich keinen Einfluß auf das Ergebnis der Hydrolyse. Ausgehend von der Annahme, daß das Zentrifugieren der Biomasse im Zuge des Waschvorganges eine geringere Zerstörung als das Zerschneiden des Myzels durch die Ultraturrax-Behandlung bewirkt, ist die geringere BTA-Hydrolyse tatsächlich auf den Medienwechsel zurückzuführen. Das Komplexmedium TSB enthält offensichtlich Bestandteile, die selbst in geringen Mengen die Hydrolyse von BTA-Filmen begünstigen.

Betrachtet man die Entwicklung der Biomasse (Bild 4.19b), so war in den mit Vorkultur beimpften Ansätzen ein Wachstum (Inokulum = 0,85 mg) bzw. eine Stagnation (Inokulum = 1,7 mg) und in den mit in Phosphatpuffer gewaschener Biomasse beimpften Ansätzen eine Stagnation (Inokulum = 0,85 mg) bzw. ein Absterben (Inokulum = 1,7 mg) festzustellen. Je geringer die Zelldichte und je besser das Nährstoffangebot, desto größer war die Wahrscheinlichkeit eines guten „Gedeihens“ der Kultur.

Der Beimpfungsmodus erwies sich somit als weniger einflußreich auf das Ergebnis der Hydrolyse als der geringfügige Zusatz weiterer Nährstoffquellen, welcher zu einer Steigerung des Gewichtsverlustes von BTA-Filmen führte. Weiterführende Untersuchungen über die Natur dieser zusätzlichen Nährstoffe werden in Kap.4.2.3.2 dargestellt.

#### **4.2.3.2 Optimierung des Mineralsalzmediums MSV**

##### pH-Wert

Das für die BTA-Hydrolyse eingesetzte Mineralsalzmedium MSV hatte standardmäßig einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,2$ . Da MCCARTHY und CROSS (1984) für Stämme der Gattung *Thermomonospora fusca* ein optimales Wachstum in einem Komplexmedium bei pH 10 beschreiben, wurde der Einfluß des pH-Wertes auf die BTA-Hydrolyse im alkalischen Bereich untersucht. Diese Untersuchungen zeigten für beide DSMZ-Stämme in flüssigem Mineralsalzmedium MSV kein ausgeprägtes Optimum oberhalb von pH 7 (Bild 4.20), so daß der pH-Wert des Mediums in den nachfolgenden Versuchen nicht verändert wurde.

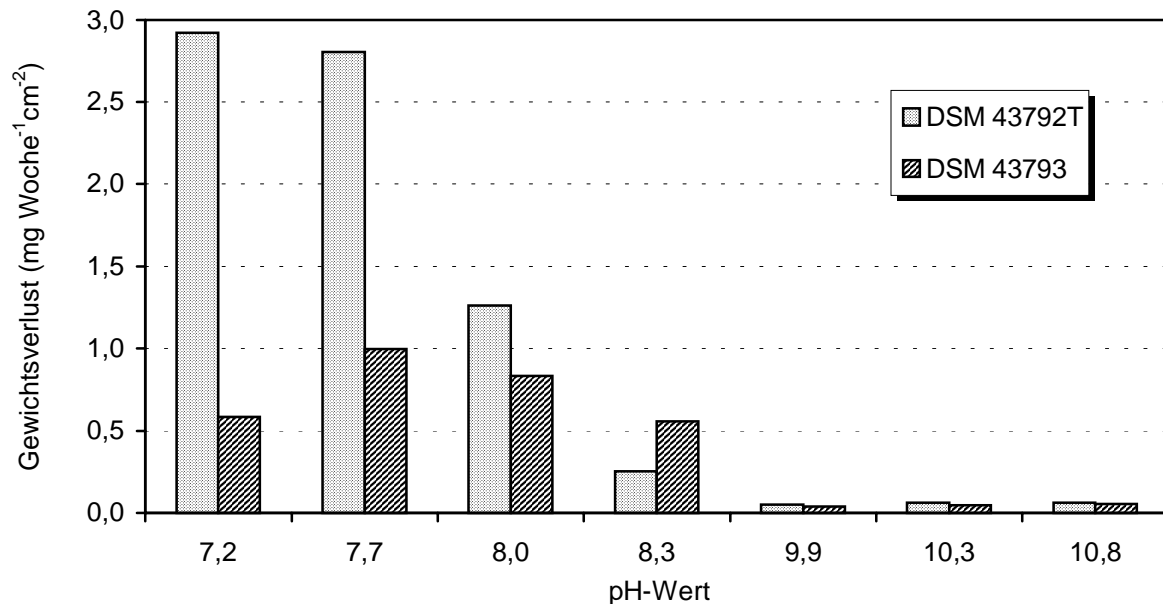


Bild 4.20 Hydrolyse von BTA-Filmen in flüssigem MSV-Medium durch *Thermomonospora fusca* DSM 43792<sup>T</sup> und DSM 43793 in alkalischem Milieu.  
 Testansatz: BTA-Filme (BTA 40/60, Ø = 2,5 cm,  $m_a = 45 \pm 5$  mg,  $n = 2$ ), 7 d, 55°C, 120 Upm.

#### Einfluß verschiedener Substratzugaben auf die BTA-Hydrolyse in Mineralsalzmedium

Bei der Optimierung des Beimpfungsmodus (Kap.4.2.3.1) wurde beobachtet, daß schon ein geringfügiger Zusatz des Komplexmediums TSB zum Mineralsalzmedium MSV eine deutliche Steigerung der BTA-Hydrolyse bewirkte. Daraufhin wurde der Einfluß der einzelnen organischen Komponenten dieses Mediums auf die Hydrolyse von BTA-Filmen durch *Thermomonospora fusca* DSM 43793 getestet. Der organische Anteil dieses Komplexmedium setzt sich laut Hersteller (MERCK 1992) aus Pepton aus Sojamehl, Pepton aus Casein und Glucose zusammen. Weiterhin wurden einige Biopolymere (Xylan, Cellulose, Pectin, Stärke, Xanthan; nach KEMPF und KUTZNER (1988)) sowie Mannose, ein Monosaccharid, das nach MCCARTHY und CROSS (1984) von *Thermomonospora-fusca*-Stämmen verwertet wird, bezüglich ihres Einflusses auf die Hydrolyse von BTA-Filmen getestet (Tabelle 4.5).

Der Vorkultur-Blindwert (VK-BW) und der Mikroorganismen-Blindwert (MO-BW) stellen eine Wiederholung der Untersuchung verschiedener Streßfaktoren (Kap.4.2.3.1, Bild 4.19) mit einer um drei Tage verkürzten Versuchszeit dar. Wiederum wirkte sich der Zusatz weiterer Nährstoffquellen zum Mineralsalzmedium steigernd auf die BTA-Hydrolyse aus (Bild 4.21). Die Zugabe von frischem, nicht durch Vorkultivierung verbrauchtem Komplexmedium (TSB) sowie von Peptonen unterschiedlicher Herkunft führte innerhalb von 24 Stunden zu einer 100%igen Hydrolyse von BTA-Filmen mit Anfangsgewichten von ca. 40 mg. Glucose, ein weiterer Bestandteil des TSB-Mediums, bewirkte hingegen eine Verringerung der BTA-



Hydrolyse im Vergleich zu dem Mikroorganismen-Blindwert (MO-BW). Abgesehen von dem Pectin, das - ähnlich wie die Peptone - eine Steigerung der BTA-Hydrolyse verursachte, wurde mit allen anderen getesteten Substanzen jeweils eine niedrigere Hydrolyse als mit dem Mikroorganismen-Blindwert erreicht.

Tabelle 4.5 Versuchsansätze zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Medienzusätze auf die BTA-Hydrolyse.

Ansatz	Substratkonzentration (%(w/v))	Inokulum
Blindwert (BW)	-	unbeimpfte Medienkontrolle
Vorkultur-Blindwert (VK-BW)	-	TSB-Vorkultur
Mikroorganismen-Blindwert (MO-BW)	-	in Phosphatpuffer gewaschene Biomasse der TSB-Vorkultur
TSB	0,1	wie MO-BW
Pepton aus Casein	0,1	wie MO-BW
Pepton aus Sojamehl	0,1	wie MO-BW
Glucose	0,1	wie MO-BW
Xylan	0,4	wie MO-BW
Cellulose	0,4	wie MO-BW
Pectin aus Äpfeln	0,5	wie MO-BW
Stärke	1,5	wie MO-BW
Xanthan	0,1	wie MO-BW
Mannose	0,1	wie MO-BW

Peptone sind Nährbodenkomponenten, die durch Behandlung von Proteinen mit Pepsin oder anderen proteolytischen Enzymen hergestellt werden und ein Gemisch aus freien Aminosäuren, Di- und Tripeptiden sowie einigen wasserlöslichen Polypeptiden enthalten. Sie können den Organismen als Energie- und Kohlenstoff- aber auch als Stickstoffquelle dienen, indem sie von den Zellen aufgenommen und durch intrazelluläre Proteasen bis zu den Aminosäuren abgebaut werden. Die Aminosäuren werden von den Zellen entweder direkt zur Proteinsynthese eingesetzt oder auf speziellen Stoffwechselwegen desaminiert und in den Intermediärstoffwechsel eingeschleust. Pectine sind dagegen komplexe Polysaccharide aus 1,4-glycosidisch verknüpfter Galakturonsäure. Als Polysaccharide liefern sie den Mikroorganismen lediglich Kohlenstoff und keinen Stickstoff (SCHLEGEL 1992, S. 402-432).

Die Tatsache, daß sowohl Peptone als auch Pectine die Hydrolyse des Copolyesters verstärken, weist auf die Existenz von zwei unterschiedlichen Mechanismen hin, bei denen es sich um Induktionsmechanismen oder um Co-Metabolismen handeln könnte.

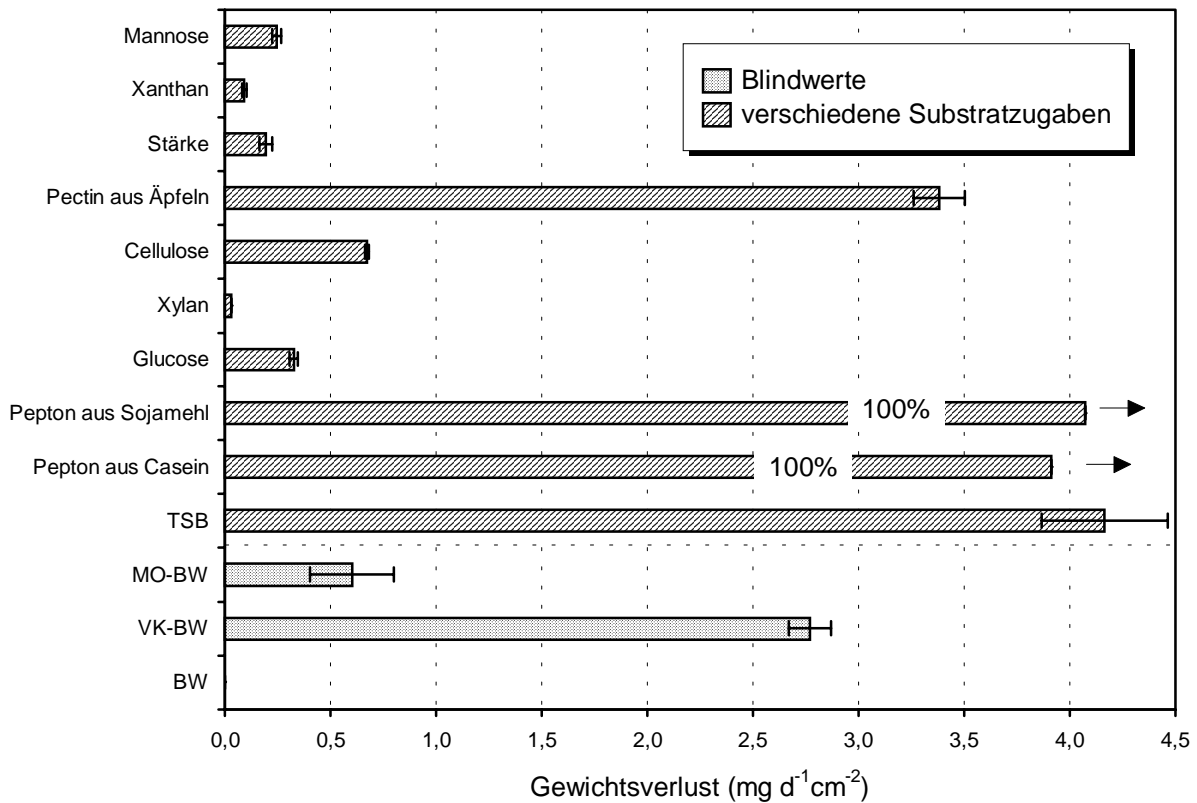


Bild 4.21 Einfluß verschiedener Substratzugaben auf die Hydrolyse von BTA-Filmen in flüssigem Mineralsalzmedium durch *Thermomonospora fusca* DSM 43793.  
 Testansätze ( $n = 3$ ): BTA-Film (BTA 40/60,  $\varnothing = 2,5$  cm,  $m_a = 35 \pm 5$  mg), 35 ml MSV-Medium, 24 h, 120 Upm, 55°C. Erklärung der Abkürzungen und Konzentrationen der Substratzugaben siehe Tabelle 4.5.

#### Einfluß der Peptonkonzentration auf die BTA-Hydrolyse

Als Co-Substrat wurde dem Pepton aus Sojamehl in nachfolgenden Versuchen der Vorzug gegenüber Pectin gegeben, da es sich um einen Bestandteil des Vorkulturmediums handelt und es zudem eine häufig verwendete Nährbodenkomponente darstellt. Versuche der BTA-Hydrolyse in dem Komplexmedium TSB hatten gezeigt, daß der Organismus auch im nährstoffreichen Medium BTA-hydrolysierende Enzyme produziert (als Beispiel siehe Bild 4.23), doch waren die Ergebnisse nicht mit denen zu vergleichen, die in Mineralsalzmedium mit geringfügigen Zugaben von TSB, Peptonen oder Pectin (Bild 4.21) erhalten wurden. Dies weist auf das Vorhandensein eines Konzentrationsoptimums hin, was durch Variation der Peptonzugaben zum Mineralsalzmedium (MSV) und die Hydrolyse von BTA-Filmen durch *Thermomonospora fusca* DSM 43793 untersucht wurde. In Bild 4.22 werden die Ergebnisse dargestellt.

Die für eine BTA-Hydrolyse optimale Peptonkonzentration im flüssigen Mineralsalzmedium MSV lag bei 0,5% Pepton. Bei niedrigeren oder höheren Konzentrationen wurden geringere Hydrolysergebnisse erzielt. Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, da die Ergeb-

nisse des ersten Versuches (Bereich 0-1% Pepton) ein Optimum der Peptonkonzentration bei 0,5% nur andeuteten, was dann mit der zweiten Versuchsreihe bestätigt wurde.

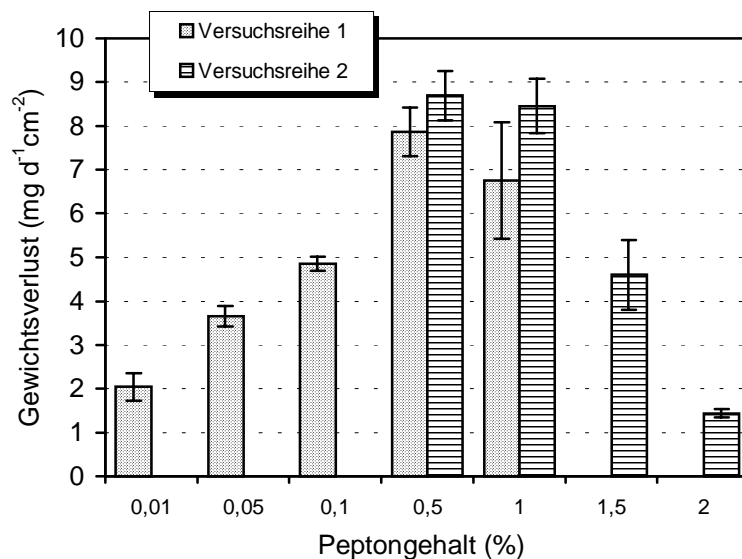


Bild 4.22

Einfluß der Peptonkonzentration auf die Hydrolyse von BTA-Filmen durch *Thermomonospora fusca* DSM 43793 in flüssigem MSV-Medium.

Testansatz (n = 4): BTA-Film (BTA 40/60, Ø = 2,5 cm,  $m_a = 60 \pm 5$  mg), 35 ml MSV/Pepton (x%), 24 h, 55°C, 120 Upm.

#### 4.2.3.3 Lokalisierung des BTA-hydrolysierenden Enzyms

Im Hinblick auf die Isolierung des extrazellulären, BTA-hydrolysierenden Enzyms mußte untersucht werden, ob es sich um ein membrangebundenes oder ein frei in die Umgebung diffundierendes Enzym handelt. Hierzu wurde *Thermomonospora fusca* K13g in fünfzehn 100-ml-Erlenmeierkolben mit je 35 ml flüssigem Komplexmedium (TSB, Kap.7.2.2.3) und BTA-Filmen kultiviert (55°C, 120 Upm). Nach 24 Stunden wurden die Gewichtsverluste der BTA-Filme bestimmt und die Kulturen durch Zentrifugation in Kulturüberstände und Biomassen getrennt. Um das Auskeimen von Actinosporen zu verhindern, wurden die Kulturüberstände sterilfiltriert und die nach einer Ultraschallbehandlung (Kap.7.4.2.1) aufgeschlossene Biomasse mit 0,4% Natriumazid versetzt. Anschließend wurden beide Kulturkomponenten mit frischen BTA-Filmen versetzt und weitere 7 Tage bei 55°C inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte wiederum eine Bestimmung des Gewichtsverlustes der BTA-Filme.

Wie in Bild 4.23 zu erkennen ist, war der Organismus *Thermomonospora fusca* K13g auch bei Kultivierung in dem nährstoffreichen Komplexmedium TSB fähig, den BTA-Copolyester zu spalten. Das Gewicht der BTA-Filme nahm in den Kulturen innerhalb von 24 Stunden um ca.  $1 \text{ mg cm}^{-2}$  ab. Der Einsatz dieses nährstoffreichen Mediums war notwendig, um genügend Biomasse für den zweiten Teil des Versuches zu erhalten.

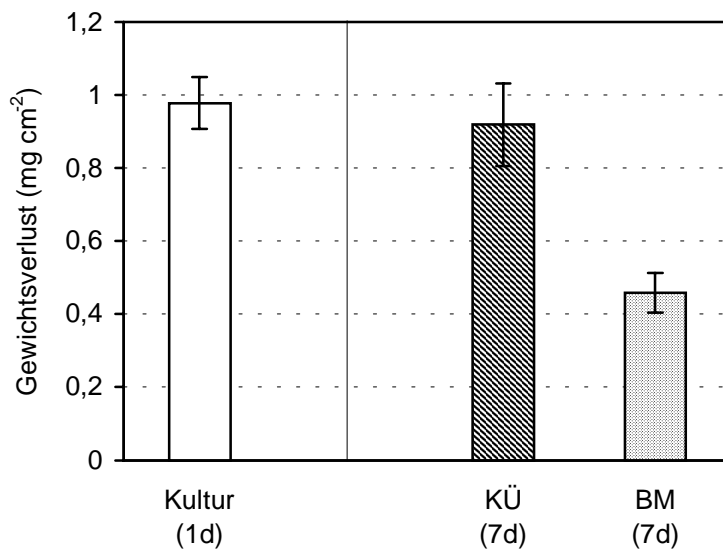


Bild 4.23

BTA-hydrolysierende Aktivität einer 24h-Kultur von *Thermomonospora fusca* K13g in Tryptic Soy Broth sowie - nach Trennung durch Zentrifugation - in dem Kulturüberstand (freie Enzymaktivität) und der Biomasse (membrangebundene Enzymaktivität).

Testansätze ( $n_{\text{Kultur}} = 15$ ,  $n_{\text{Kulturüberstand}} = 15$ ,  $n_{\text{Biomasse}} = 5$ ): BTA-Filme (BTA 40/60,  $\varnothing = 2,5$  cm,  $m_a = 35 \pm 5$  mg),  $55^\circ\text{C}$ ; weitere Erklärungen siehe Text.

Bei Vergleich der Enzymaktivität der Kulturüberstände mit derjenigen der Biomassen wurde festgestellt, daß die Gewichtsverluste der BTA-Filme in den Kulturüberständen mit  $0,9 \text{ mg cm}^{-2}$  doppelt so groß war wie die der Filme in den zerstörten Biomassen. Ein großer Teil der in der vollständigen Kultur wirksamen Enzyme war demnach frei im Kulturüberstand zu finden. Die Enzymaktivitäten der Kultur und der Kulturkomponenten lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Versuchszeiten nicht direkt miteinander vergleichen.

#### 4.2.3.4 Regulation der Enzymproduktion

Vielen Bakterien ist es möglich, auf einer großen Zahl verschiedener Nährstoffe zu wachsen. Dies setzt voraus, daß sie die zur Umsetzung dieser Substrate nötigen Enzyme bilden können. Aufgrund der geringen Abmessungen der Bakterien spielen dabei zelluläre Regulationsmechanismen eine wichtige Rolle, weil die Bakterien aus „Platzgründen“ und ökonomischen Gründen nicht alle produzierbaren Enzyme in der Zelle vorrätig halten können. Da es sich nach SCHLEGEL (1992, S. 475) bei den meisten am Substratabbau beteiligten Enzymen um induktive Enzyme handelt, d.h. Enzyme, die nur gebildet werden, wenn sich der betreffende Nährstoff in der Umgebung der Zelle befindet, war dies auch für das BTA-hydrolysierende Enzym anzunehmen.

Über die Natur des Enzyms und über den möglichen Induktor konnte lediglich spekuliert werden. Es ist bekannt, daß z.B. Chymotrypsin als unspezifische Protease auch Esterbindungen zu spalten vermag, bei denen aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan die Carboxylgruppe stellen (STELLMACH et al. 1988, S. 97; PHYTHIAN 1998). So lag es nahe, hinter der gesteigerten Produktion der BTA-Hydrolase bei Zusatz von Peptonen zum Mineralsalzmedium die Induktion einer Protease zu vermuten, die in der Lage ist, den BTA-Copolyester zu spalten.

Zur Kontrolle dieser Annahme wurde reines sowie mit Pepton versetztes MSV-Medium jeweils mit und ohne BTA-Filme eingesetzt und mit *Thermomonospora fusca* DSM 43793 beimpft. Nach 24 Stunden wurden die BTA-Hydrolyse und die Gesamtbiomasse in der Kultur über Gewichtsbestimmungen sowie die Enzymaktivität in den Kulturüberständen mittels Clear Zone Test untersucht.

Tabelle 4.6 Versuch der Induktion BTA-hydrolysierender Enzyme durch Peptonzugabe zum Mineralsalzmedium MSV.

Testansatz ( $n = 3$ ): BTA-Film (BTA 40/60,  $\varnothing = 2,5$  cm,  $m_a \approx 40$  mg), 35 ml Medium (siehe unten), 24 h, 55°C, 120 Upm.

Kulturansatz	BTA-Hydrolyse in der Kultur ( $\text{mg d}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	Gesamtbiomasse in der Kultur <sup>a</sup> (mg)	BTA-Enzymaktivität im Kulturüberstand Clear Zone Test <sup>b</sup>
MSV/Pep(0,1%) + BTA	$3,8 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,6$	+++
MSV/Pep(0,1%)	-	$4,7 \pm 0,1$	-
MSV + BTA	$0,7 \pm 0,07$	$1,2 \pm 0,1$	+
MSV	-	$1,0 \pm 0,1$	-

<sup>a</sup> Das Inokulum enthielt  $2,3 \pm 0,2$  mg Biomasse.

<sup>b</sup> Bewertung siehe Tab.7.9 (Kap.7.4.4.4)

Aus den Ergebnissen, die in Tabelle 4.6 dargestellt werden, ist klar erkennbar, daß die Produktion BTA-hydrolysierender Enzyme bei Anwesenheit des BTA-Copolyesters in der Kultur induziert wird; nur in den Versuchsansätzen, die BTA-Filme enthielten, wurde hydrolytische Aktivität in den Kulturüberständen nachgewiesen. Durch die Zugabe von Pepton wurde das verantwortliche Enzymsystem nicht induziert. Somit trifft die Annahme, bei dem BTA-hydrolysierenden Enzym könnte es sich um eine unspezifische Protease handeln, nicht zu.

Der Gewichtsverlust von BTA-Filmen in den Kulturen, die den BTA-Copolyester als alleinigen organischen Nährstoff enthielten („MSV + BTA“), war mit ca.  $0,7 \text{ mg d}^{-1} \text{cm}^{-2}$  wesentlich geringer als in den mit Pepton versetzten Kulturen, doch lag er deutlich oberhalb des Meßfehlers der Methode ( $\pm 0,3$  mg absolut). Die Gesamtbiomasse dieser Kulturen nahm mit 1,2 mg im Vergleich zum Inokulum (2,3 mg) um knapp 50% ab. Offensichtlich reichte die Nährstoffversorgung für die Mikroorganismen in diesen Kulturen nicht aus. Trotzdem wurden von den Zellen BTA-hydrolysierende Enzyme synthetisiert, deren Aktivität auch im zellfreien Kulturüberstand meßbar war. Da das Medium - bis auf den BTA-Copolyester - keine weiteren organischen Substanzen enthielt und der Clear Zone Test der Medienkontrolle „MSV“ (Mineralsalzmedium + Mikroorganismus, ohne BTA) keine Enzymaktivität ergab, muß die Enzymsynthese durch Bestandteile des Copolyesters induziert worden sein.

Daraufhin wurde *Thermomonospora fusca* DSM 43793 analog zum vorherigen Versuch in MSV/Pepton(0,1%)-Medium mit Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen der einzelnen Copolyesterkomponenten (1,4-Butandiol, Na-Terephthalat und Na-Adipat) über 24 h kultiviert. Anschließend wurde die Gesamtbiomasse in der Kultur mittels Gewichtsbestimmung und die BTA-Enzymaktivität im zellfreien Kulturüberstand mittels Clear Zone Test ermittelt. Die Ergebnisse werden in Tabelle 4.7 dargestellt.

Tabelle 4.7 Versuch der Induktion BTA-hydrolysierender Enzyme durch die Komponenten des BTA-Copolyesters.  
Testansatz (n = 4): 35 ml MSV/Pepton(0,1%)-Medium mit Substratzusatz (siehe unten), 24 h, 55°C, 120 Upm.

Kulturansatz		Gesamtbiomasse in der Kultur <sup>a</sup> (mg)	BTA-Enzymaktivität in der Kultur Clear Zone Test <sup>b</sup>
1,4-Butandiol	0,02%	4,9 ± 0,7	-
	0,1%	5,3 ± 0,7	-
	0,2%	3,9 ± 0,7	-
Terephthalat	0,02%	4,9 ± 0,4	-
	0,1%	4,9 ± 0,7	-
	0,2%	4,9 ± 1,0	-
Adipat	0,02%	5,6 ± 0,4	-
	0,1%	5,6 ± 1,0	-
	0,2%	5,3 ± 0,4	-
MSV/Pep(0,1%)		5,1 ± 0,4	-

<sup>a</sup> Das Inokulum enthielt 2,2 ± 0,1 mg Biomasse.

<sup>b</sup> Bewertung siehe Tab. 7.9 (Kap.7.4.4.4)

In allen Kulturen, auch in der Medienkontrolle (MSV/Pep(0,1%)), fand ein relativ gleichmäßiges Wachstum der Biomasse statt, das dem des vorherigen Versuches ähnlich war (Vergleich von Tabelle 4.6 und Tabelle 4.7). Dementsprechend ist das Wachstum auf die Nutzung des Peptons im Medium zurückzuführen und weniger auf den Verbrauch der BTA-Monomere. Letztere haben in den eingesetzten Konzentrationen offensichtlich keinen hemmenden Einfluß auf das Wachstum von *Thermomonospora fusca* DSM 43793. Sie stellen allerdings keine Induktoren für BTA-hydrolysierende Enzyme dar; in keinem der Kulturansätze wurde eine Enzymaktivität gemessen (Tabelle 4.7), wohingegen in Versuchen mit dem BTA-Copolyester bereits innerhalb von 24 h hohe BTA-hydrolysierende Aktivitäten nachweisbar waren.

In Kap. 4.2.2.3 wurde beschrieben, daß der Gesamtorganismus *Thermomonospora fusca* in der Lage war, verschiedene Polyesterstrukturen zu spalten. Zur Beantwortung der Frage,

ob es sich dabei um ein und dasselbe recht unspezifische Enzymsystem handelt oder ob der Organismus fähig ist, ganz spezifische Enzyme für die unterschiedlichen Strukturen zu produzieren, wurde Polyhydroxybuttersäure (P(3HB)) als alternativer, bioabbaubarer Polyester parallel zu dem BTA-Copolyester in dem folgenden Experiment eingesetzt. Jeweils in Dreifachbestimmungen wurden Kulturen von *Thermomonospora fusca* DSM 43793 entweder mit BTA-Filmen oder mit PHB-Filmen oder ohne zusätzliches Polymer in flüssigem MSV/Pepton(0,1%)-Medium inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Gewichtsverlust der Filme ermittelt. Die Kulturüberstände wurden mit Hilfe des Clear Zone Tests sowohl auf BTA- als auch PHB-Polymeragarplatten untersucht (Kap.7.4.4.4).

Es konnte die Existenz von zwei unterschiedlichen Enzymen für die beiden eingesetzten Polymere nachgewiesen werden (Tabelle 4.8). Beide Enzyme wurden durch die Anwesenheit der jeweiligen Makromoleküle induziert. Wuchs die Kultur in Anwesenheit des BTA-Copolyesters, so konnten im Kulturüberstand BTA-hydrolysierende Enzyme nachgewiesen werden, die nicht in der Lage waren, P(3HB) zu spalten.

Tabelle 4.8 Untersuchung der Aktivität des BTA-hydrolysierenden Enzyms gegenüber dem natürlichen Polyester Polyhydroxybuttersäure (P(3HB)).  
Kulturansätze (n = 3): Polymerfilme ( $\varnothing = 2,5$  cm), P(3HB):  $m_a = 70 \pm 2$  mg, BTA 40/60:  $m_a = 80 \pm 2$  mg), 35 ml MSV/Pepton(0,1%)-Medium, 24 h, 55°C, 120 Upm.

Flüssigkultur		Kulturüberstand	
Kultur gewachsen	Hydrolyse <sup>a</sup> (mg/d)	getestet auf	Aktivität <sup>b</sup> (CZT)
mit BTA-Filmen	42,1 $\pm$ 4,2	BTA-Hydrolyse	++++
		PHB-Hydrolyse	-
ohne Polymer	-	BTA-Hydrolyse	-
		PHB-Hydrolyse	+
mit P(3HB)-Filmen	22,5 $\pm$ 0,7	BTA-Hydrolyse	+
		PHB-Hydrolyse	+++

<sup>a</sup> Gewichtsverlust der Polymerfilme während der Kultur.

<sup>b</sup> Bestimmung Polymer-hydrolysierender Aktivität im zellfreien Kulturüberstand durch Clear Zone Test mit BTA- und PHB-Agarplatten; Durchführung und Bewertung siehe Kap.7.4.4.4.

Demgegenüber konnte in den Kulturüberständen von mit P(3HB) gewachsenen Kulturen sowohl eine hohe Hydrolyseaktivität gegenüber P(3HB) als auch eine niedrige Hydrolyseaktivität gegenüber dem BTA-Copolyester beobachtet werden. Da die hydrolytischen Enzyme in den PHB-Kulturüberständen nicht weitergehend untersucht wurden, wurde nicht geklärt, ob die „PHB-Depolymerase“ über BTA-Hydrolyseeigenschaften verfügte oder ob der Biopolyester P(3HB) die Produktion geringer Mengen der BTA-Hydrolase induzierte. Auffallend war, daß in den ohne Polymer gewachsenen Kulturen eine geringe PHB-hydrolysierende

Aktivität beobachtet wurde, die in den mit BTA-Copolyester gewachsenen Kulturen nicht nachweisbar war.

#### 4.2.3.5 Aufnahme von Hydrolysekurven in Flüssigkultur

Der zeitliche Verlauf der BTA-Hydrolyse durch *Thermomonospora fusca* DSM 43793 in flüssigem Mineralsalzmedium wurde hinsichtlich der BTA-Hydrolyse, der Produktion BTA-hydrolysierender Enzyme sowie der Biomasseentwicklung während der Kultur untersucht. Es wurden dreißig 100-ml-Erlenmeierkolben à 35 ml MSV/Pepton(0,1%)-Medium mit einer Vorkultur von *Thermomonospora fusca* DSM 43793 beimpft und mit BTA-Filmen versetzt. Als Blindversuche wurden weitere zwölf Kolben ohne BTA-Filme auf die gleiche Weise beimpft. Zu unterschiedlichen Zeiten wurde in jeweils drei Kolben der Gewichtsverlust der BTA-Filme in der Kultur, die Aktivität BTA-hydrolysierender Enzyme im Kulturüberstand (Reagenzglas-Methode, Kap.7.4.4.1) und die Biomasse bestimmt. Außerdem wurden die Proteine in den Kulturüberständen durch Trennung mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht.

Die Entwicklung der Biomasse zeigte in den mit BTA gewachsenen und in den Blindwert-Kulturen ohne BTA innerhalb der ersten 8 Stunden einen sehr ähnlichen Verlauf (Bild 4.24c). Nach einer zweistündigen lag-Phase folgte eine exponentielle Wachstumsphase von ca. 6 Stunden. Danach traten Unterschiede auf: während die mit BTA gewachsenen Kulturen in eine stabile stationäre Phase übergingen und erst nach 30 Stunden eine langsame Abnahme der Biomasse in den Kulturen zu verzeichnen war, nahm die Biomasse in den ohne BTA gewachsenen Kulturen bereits nach 8 Stunden ab.

Nach ca. vier Stunden konnten im Kulturüberstand BTA-hydrolysierende Enzyme nachgewiesen werden (Bild 4.24b). Die Produktion BTA-hydrolysierender Enzyme folgte dem Wachstum der Mikroorganismen. Nach ca. 20 Stunden wurde nur noch eine geringe Steigerung der Enzymaktivität in den geernteten Kulturüberständen beobachtet. Entweder stagnierte die Enzymproduktion und die Aktivität blieb bis zum Ende des Versuches stabil, oder es stellte sich ein Gleichgewicht zwischen Enzymproduktion und Enzymzerfall ein. In den ohne BTA gewachsenen Kulturen konnte keine signifikante BTA-Enzymaktivität in den Kulturüberständen nachgewiesen werden.

Da die Enzymaktivitäten in den Kulturüberständen erst nach 4 Stunden meßbare Werte erreichten, wurde ein Gewichtsverlust von BTA-Filmen in der Kultur erst nach ca. 8 Stunden festgestellt (Bild 4.24a). Nach weiteren 16 Stunden, in denen der Gewichtsverlust der Filme mit relativ konstanter Geschwindigkeit ablief, waren die Filme vollständig zerfallen. Auf die Darstellung der Fehlerbalken in Bild 4.24 wurde nach 28 Stunden verzichtet, da sie ab diesem Zeitpunkt nur noch die Variation der Ausgangsmassen der Polymerfilme wiedergegeben hätten.



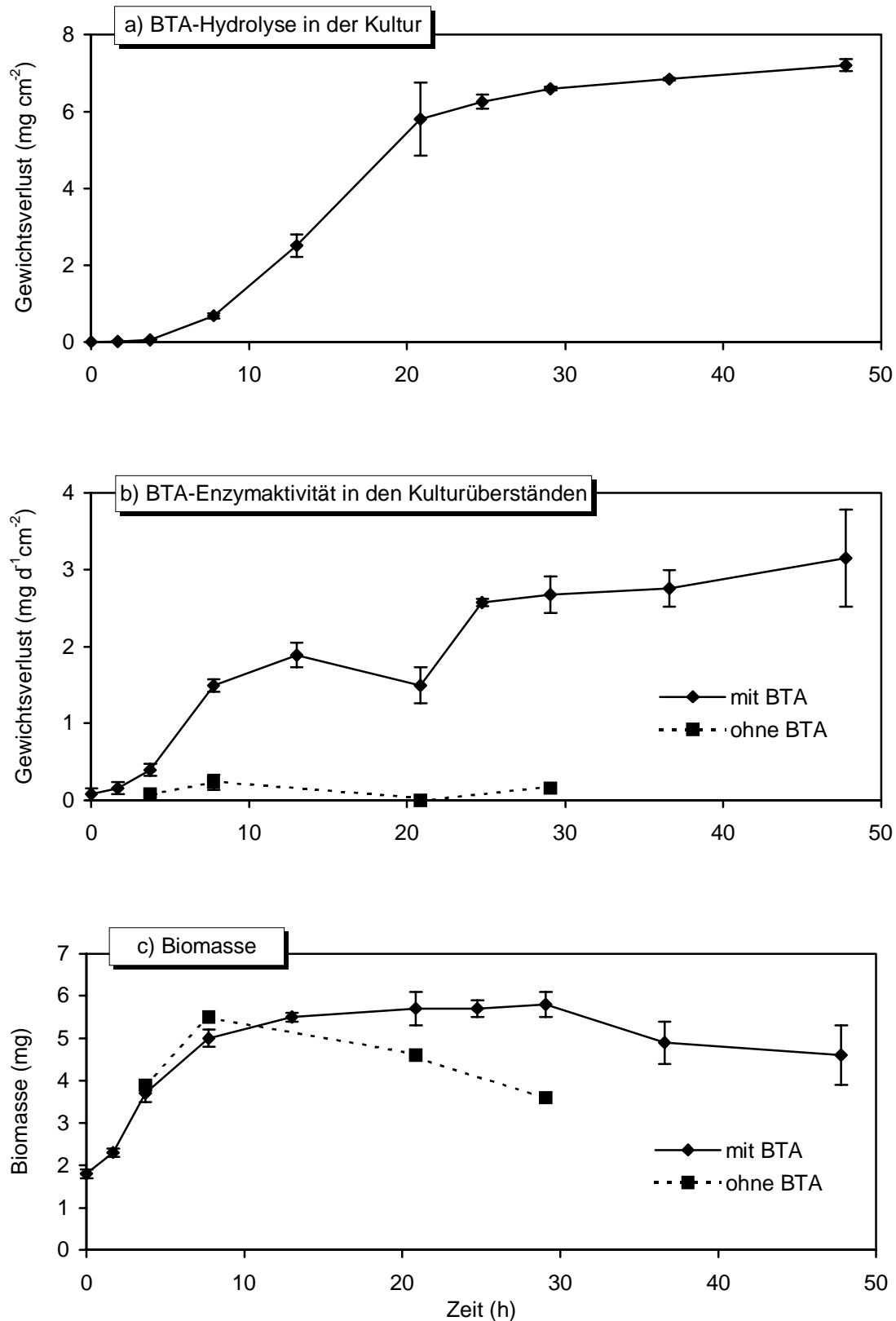
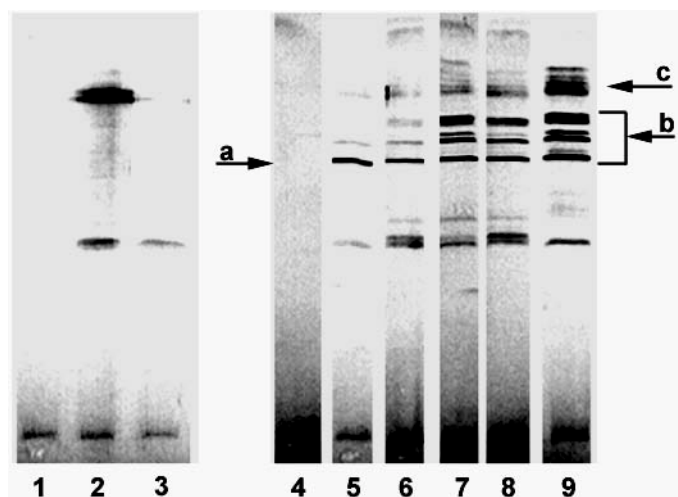


Bild 4.24 Zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von BTA-Filmen in flüssigem MSV/Pepton(0,1%)-Medium durch *Thermomonospora fusca* DSM 43793.

Die Entwicklung der Biomasse innerhalb der ersten 8 Stunden ist sicherlich auf die Verwertung des Peptons im Medium zurückzuführen, da die Kulturen sowohl mit als auch ohne BTA-Filme einen ähnlichen Wachstumsverlauf zeigten. Danach wies der Rückgang der Biomasse in den nicht mit BTA wachsenden Kulturen allerdings auf ein Sterben von Zellen hin. In den mit dem BTA-Copolyester wachsenden Kulturen hatte die Hydrolyse der BTA-Filme bereits begonnen. Der Eintritt in die stationäre Wachstumsphase ließ vermuten, daß der Mikroorganismus Bestandteile des BTA-Copolyesters zum „Erhalt“ der vorhandenen Biomasse zu nutzen vermag. Dieser Zustand hielt noch ca. 5 Stunden nach der vollständigen Hydrolyse der BTA-Filme an, bevor auch in diesen Kulturen ein langsames Sterben der Zellen begann.

Mittels SDS-Gelelektrophorese wurden bei Vergleich der Kulturansätze mit und ohne BTA 5 Proteinbanden beobachtet, die nur in den mit BTA gewachsenen Kulturen erschienen (Bild 4.25 „b“). Deshalb wurde vermutet, daß es sich bei einer oder mehrerer dieser Banden um das BTA-hydrolysierende Enzym(system) handelte. Nach 8 Stunden war die erste dieser Banden bereits deutlich sichtbar (Bild 4.25 „a“). Die vielen Banden mit den Molekulargewichten  $\leq 14,4$  kDa, die nach einer Kulturdauer von mehr als 25 Stunden erschienen, bestanden wahrscheinlich aus Autolyseprodukten der Organismen und zeigten das Sterben der Zellen an (Bild 4.25 „c“).



Kultur ohne BTA-Copolyester:

Bahn 1: 4 Stunden  
Bahn 2: 8 Stunden  
Bahn 3: 20 h

Kultur mit BTA-Copolyester:

Bahn 4: 0 Stunden  
Bahn 5: 8 Stunden  
Bahn 6: 12 Stunden  
Bahn 7: 24 Stunden  
Bahn 8: 36 Stunden  
Bahn 9: 48 Stunden

Bild 4.25 Untersuchung der Proteine in den Kulturüberständen mittels SDS-Gelelektrophorese (Silberfärbung).

a ~30 kDa, b ~30 - 21,5 kDa, c ~14,4 kDa; weitere Erklärungen siehe Text.

## 4.2.4 Untersuchungen zur Metabolisierung der Spaltprodukte des BTA-Copolyesters

### 4.2.4.1 Vorbemerkungen

Über die Bestimmung des Gewichtsverlustes von Polyesterfilmen können Enzyme, die die Esterbindungen der Polymerkette zu spalten vermögen, nachgewiesen werden. Ihr Nachweis stellt jedoch keinen Beweis für den Abbau der BTA-Filme im Sinne einer vollständigen Metabolisierung dar. Um die Metabolisierung der BTA-Spaltprodukte durch *Thermomonospora fusca*-Stämme zu untersuchen, wurden respirometrische Tests durchgeführt.

### 4.2.4.2 Respirometrische Tests auf Agarplatten

Während der Gewichtsverlust von BTA-Filmen in flüssigem Mineralsalzmedium ohne Zusatz von Supplementen wie z.B. Pepton zu nicht-reproduzierbaren Ergebnissen führte, zeichneten sich die Versuche auf reinen Mineralsalz-Agarplatten durch eine sehr gute Reproduzierbarkeit aus. Um die Hintergrundaktivität der CO<sub>2</sub>-Entwicklung aus den zusätzlichen Kohlenstoffverbindungen gering zu halten, wurden zunächst respirometrische Messungen während der BTA-Hydrolyse durch *Thermomonospora fusca* K13g auf MSV-Agarplatten durchgeführt. Die CO<sub>2</sub>-Bestimmung erfolgte über die Absorption von Kohlenstoffdioxid in Bariumhydroxid-Lösungen (Kap.7.3.1). Bei dieser Methode wird das Kohlenstoffdioxid kumulativ bestimmt, so daß insbesondere geringe CO<sub>2</sub>-Mengen detektiert werden können.

Obwohl die BTA-Filme innerhalb des Versuchszeitraumes von 7 Tagen vollständig desintegrierten, konnte keine dem angebotenen Kohlenstoff entsprechende CO<sub>2</sub>-Entwicklung festgestellt werden (Bild 4.26). Weder in der CO<sub>2</sub>-Entwicklung noch im visuell beurteilten Wachstum wurden bemerkenswerte Unterschiede der Actinomyceten-Kulturen auf dem reinen Agar (MO-BW) und auf der Agarplatte mit BTA-Filmen (MO + BTA) beobachtet. Das geringe Wachstum von *Thermomonospora fusca* K13g kann durch die Verwertung von Agar bedingt sein, die für Stämme dieser Art in der Literatur (MCCARTHY und CROSS 1984, KEMPF und KUTZNER 1988) beschrieben ist. Die geringfügig höhere CO<sub>2</sub>-Entwicklung der mit Organismen beimpften Platten verglichen mit dem BTA-Blindwert resultiert demnach aus der Veratmung des Agars durch den schwach wachsenden Mikroorganismus.

Grundsätzlich konnte aus dem Abbauverhalten des Mikroorganismus auf einer Agarplatte mit Komplexmedium die Funktionalität des CO<sub>2</sub>-Nachweissystems sowie die Lebensfähigkeit der Actinomyceten verifiziert werden; hier war eine signifikante respirometrische Aktivität meßbar.

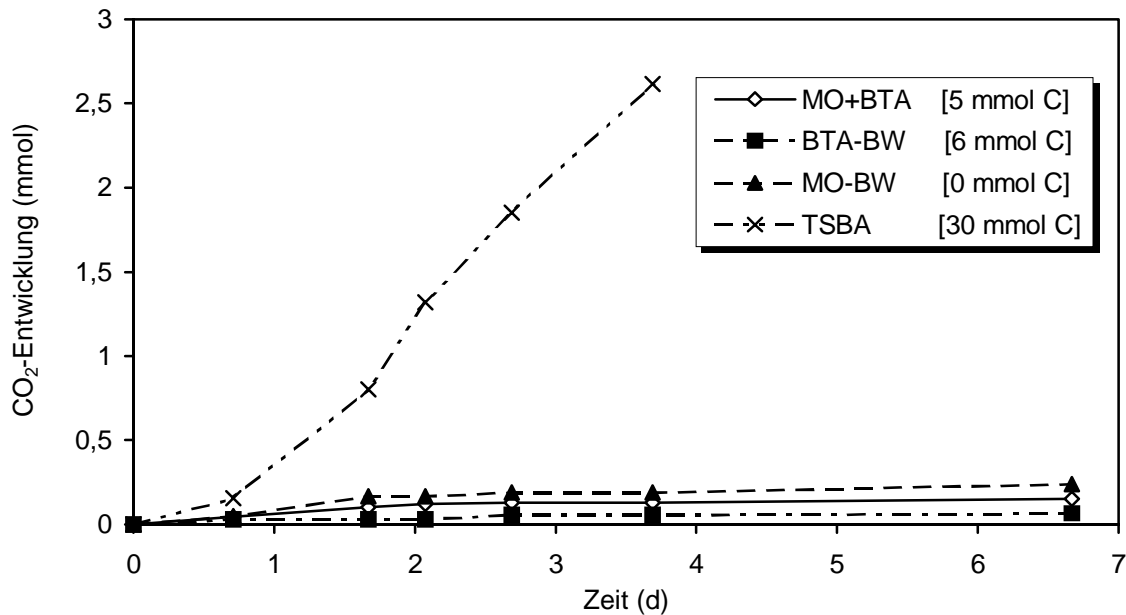


Bild 4.26 CO<sub>2</sub>-Entwicklung während des Abbaus von BTA-Filmen auf MSV-Agar durch *Thermomonospora fusca* K13g.  
MO Mikroorganismus, BW Blindwerte: BTA-Filme bzw. Mikroorganismen auf MSV-Agar.  
 Die Werte in den eckigen Klammern geben die CO<sub>2</sub>-Mengen an, die bei vollständiger Veratmung gebildet werden würden.

#### 4.2.4.3 Respirometrische Tests in Flüssigkultur

In flüssigem Mineralsalzmedium war bei Zusatz geringer Mengen von Supplementen (z.B. Pepton) neben einem guten Wachstum der Biomasse eine gesteigerte Hydrolyse des BTA-Copolyesters zu beobachten. Sofern Bestandteile des BTA-Copolyesters metabolisiert werden können, sollte aus der größeren Biomasse eine Erhöhung der emittierten CO<sub>2</sub>-Menge resultieren.

Aus diesen Überlegungen wurde mit *Thermomonospora fusca* DSM 43793 ein respirometrischer Abbautest mit dem BTA-Copolyester, sowie den Komponenten des Copolyesters (Terephthalat, Adipat und 1,4-Butandiol) in flüssigem MSV/Pepton(0,5%)-Medium durchgeführt. Aufgrund der zu erwartenden höheren CO<sub>2</sub>-Mengen aus der Veratmung des Peptonanteiles des Mediums wurde für die CO<sub>2</sub>-Detektion in diesem Versuch ein Infrarot-System eingesetzt, da das titrimetrische Verfahren experimentelle Probleme mit sich gebracht hätte (Kap.7.3.2). Die durch die zusätzliche Kohlenstoffquelle (Pepton) hervorgerufene CO<sub>2</sub>-Entwicklung wurde durch den Blindwert berücksichtigt, der das mit dem Mikroorganismus beimpfte Medium, jedoch keine weiteren Testsubstanzen enthielt.

In Bild 4.27 sind die entsprechenden Respiurationskurven dargestellt. Die Reaktoren mit den Monomerkomponenten und der Blindwert zeigten bis zum 7.Tag des Versuches einen identischen Kurvenverlauf, der die Veratmung des Peptons im Medium anzeigt. Auffällig ist die starke Zunahme der CO<sub>2</sub>-Bildung für die Adipat-Reaktoren nach ca. 8 Tagen. Unter Berück-

sichtigung des Mikroorganismen-Blindwertes waren bei Versuchsende ca. 3 % des eingesetzten Adipats von den Organismen veratmet worden. Die auftretenden Differenzen zwischen dem Blindwert und den Reaktoren mit Terephthalat und 1,4-Butandiol wurden wahrscheinlich durch Kontaminationen mit stäbchenförmigen Bakterien verursacht, die bei Versuchsabbruch mikroskopisch nachgewiesen wurden.

In den Reaktoren, die den BTA-Copolyester enthielten, wurde vom ersten Tag an eine deutlich höhere respirometrische Aktivität als in allen anderen Reaktoren beobachtet. Dabei wurden - unter Berücksichtigung des Mikroorganismen-Blindwertes - knapp 10% des BTA-Kohlenstoffes innerhalb der ersten fünf Tage des Testzeitraumes veratmet. Gemeinsam mit den Ergebnissen der Adipat-Reaktoren ist dies als Hinweis zu werten, daß geringe Anteile des BTA-Copolyesters von *Thermomonospora fusca* DSM 43793 metabolisiert werden können. Darauf weisen auch die Ergebnisse eines vorhergehenden Versuches hin, bei dem die Biomasseentwicklung in Kulturen, die mit und ohne BTA-Filmen wuchsen, untersucht wurde (Kap.4.2.3.5). Die Anwesenheit des BTA-Copolyesters wirkte sich dabei vorteilhaft auf das Wachstum bzw. die Stabilisierung der Biomasse von *Thermomonospora-fusca*-Stämmen aus (Bild 4.24).

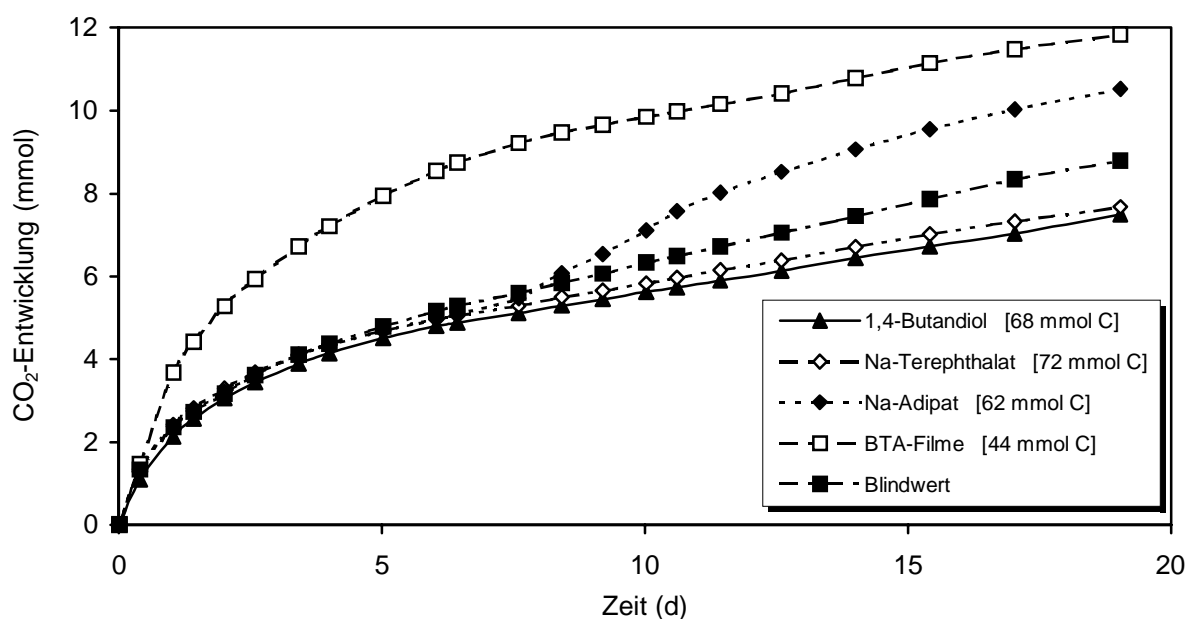


Bild 4.27 CO<sub>2</sub>-Entwicklung während des Abbaus von 1,4-Butandiol, Na-Terephthalat, Na-Adipat und BTA-Filmen durch *Thermomonospora fusca* DSM 43793. Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Werte in den eckigen Klammern geben die CO<sub>2</sub>-Mengen an, die bei vollständiger Veratmung gebildet werden würden.

Zusammenfassend ergeben die Untersuchungen, daß die *Thermomonospora-fusca*-Stämme trotz ihrer hohen BTA-hydrolysierenden Aktivität nicht zum vollständigen Abbau des Copolyesters fähig sind. Mit der Spaltung der Polyesterkette in kleinere Spaltstücke

leistet der Organismus aber eine „Vorarbeit“, so daß möglicherweise andere Organismen im Prozeß der Kompostierung in den Abbauprozess eingreifen können.

Um die grundsätzliche Abbaubarkeit des BTA-Copolyesters im Kompost zu überprüfen, wurde der Abbau der Monomere des Copolyesters (1,4-Butandiol, Terephthalat und Adipat) durch eine Mischpopulation aus Kompost gleichfalls mit Hilfe von respirometrischen Messungen untersucht (Bild 4.28).

Nach unterschiedlichen lag-Phasen von zwei bis hin zu sieben Tagen wurden alle Substanzen schnell metabolisiert. Innerhalb der Versuchszeit von 22 Tagen wurde das Terephthalat zu 85%, das Adipat zu 68% und das Butandiol zu 44% in  $\text{CO}_2$  umgesetzt. Entsprechend der zu berücksichtigenden Bildung neuer Biomasse sind die Abreicherungsgrade für die Substanzen noch höher anzusetzen. Hiermit konnte gezeigt werden, daß alle Substanzen in den eingesetzten Konzentrationen abgebaut werden und keine toxischen Wirkungen vorliegen, die einen Abbau verhindern.

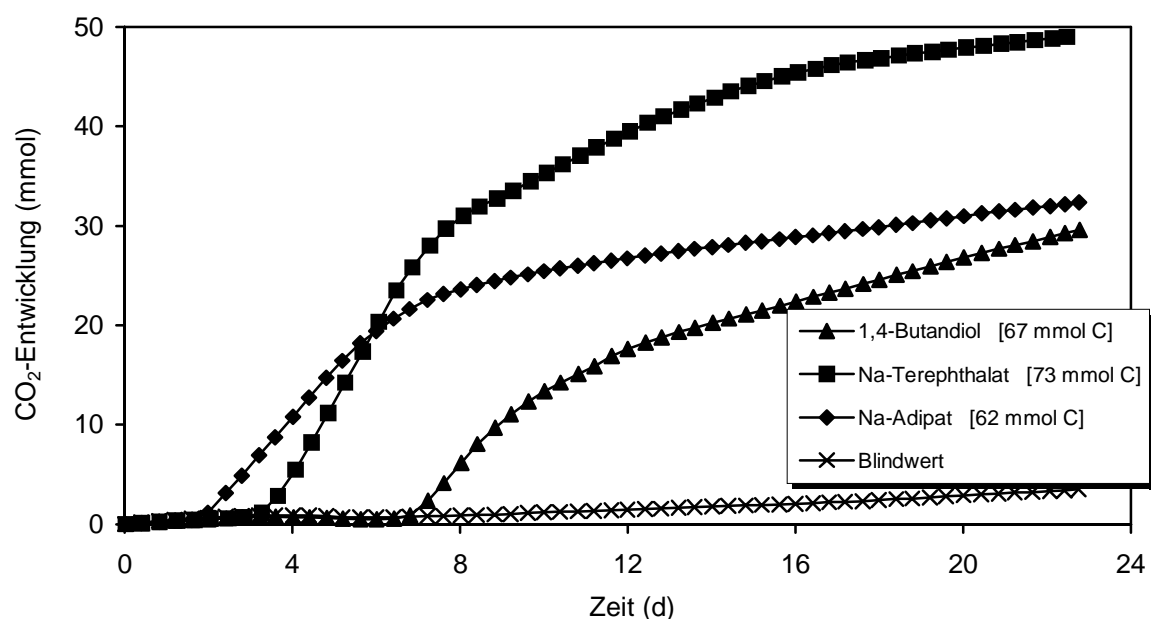


Bild 4.28 Abbau von 1,4-Butandiol, Na-Terephthalat und Na-Adipat durch eine Komposteluat. Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die Werte in den eckigen Klammern geben die  $\text{CO}_2$ -Mengen an, die bei vollständiger Veratmung gebildet werden würden.

## **4.3 Isolierung und Charakterisierung des BTA-hydrolysierenden Enzyms**

### **4.3.1 Methoden zum Nachweis BTA-hydrolysierender Enzyme**

#### **4.3.1.1 Vorbemerkungen**

Die Isolierung eines Enzyms setzt das Vorhandensein eines geeigneten Tests zum Nachweis der Enzymaktivität in den anfallenden Reinigungsfractionen voraus. Ein solcher Test muß nach COOPER (1980, S. 334) vier Bedingungen erfüllen: (1) hohe Selektivität gegenüber dem zu isolierenden Enzym, (2) große Empfindlichkeit, d.h. geringer Verbrauch an Enzymlösung, (3) hohe Reproduzierbarkeit und (4) möglichst einfache Durchführbarkeit. Diesbezüglich werden im Folgenden unterschiedliche Methoden miteinander verglichen, die in dieser Arbeit zum Nachweis BTA-hydrolysierender Aktivität herangezogen wurden.

#### **4.3.1.2 Gewichtsverlust von Polymerfilmen**

Die Bestimmung des Gewichtsverlustes von Polymerfilmen nach der „Macro-Methode“ (Kap.7.4.4.1) stellt ein indirektes Verfahren zur Untersuchung der Spaltung der Polyesterkette und damit der Enzymaktivität dar. Ein wichtiger Parameter dieser Methode ist die Versuchsdauer. Sie muß einerseits lang genug sein, damit ein Gewichtsverlust der Filme nachgewiesen werden kann (Wägefehler von  $\pm 0,3$  mg), ist aber andererseits zeitlich begrenzt durch die Stabilität des BTA-hydrolysierenden Enzyms, welches durch eventuell im Kulturüberstand vorhandene Proteasen oder durch die Inkubationstemperatur (55°C) einem Aktivitätsverlust unterliegen kann.

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Hydrolyse von BTA-Filmen in zellfreien Kulturüberständen nach der Macro-Methode (Kap.7.4.4.1) ergab eine nahezu konstante Geschwindigkeit des Gewichtsverlustes während der ersten 48 Stunden (Bild 4.29). Innerhalb dieser Zeit wurden ca. 3 mg der BTA-Filme hydrolysiert. Anschließend nahm die Hydrolyseaktivität des Enzyms schnell ab und war ab dem 4. Versuchstag nicht mehr nachweisbar. Ein Schütteln der Proben brachte keinen Vorteil gegenüber stehenden Proben. In beiden Fällen betrug der Gewichtsverlust der BTA-Filme nach 6 Tagen 5,2 mg.

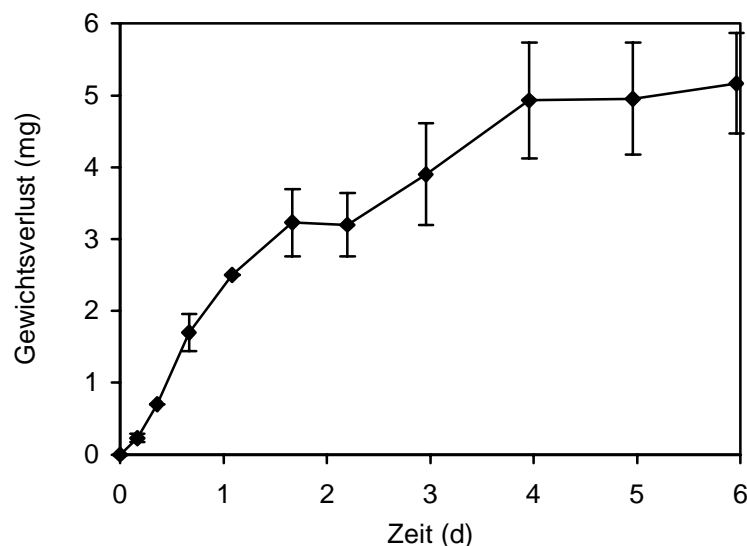


Bild 4.29

Enzymatische Hydrolyse von BTA-Filmen in Kulturüberständen von *T. fusca* K13g über einen Zeitraum von 6 Tagen.

Testansatz (n=3): BTA-Film ( $\varnothing = 2,5$  cm,  $m_a = 50 \pm 5$  mg), 10 ml Kulturüberstand, 6 d, 55°C, stehend (Macro-Methode, Kap.7.4.4.1)

Der Test wurde daraufhin auf weniger als 48 Stunden verkürzt und kleinere BTA-Filme ( $\varnothing = 0,9$  cm) in Reagenzgläsern mit maximal 2 ml Probenvolumen verwendet. Selbst für diese Reagenzglas-Methode wurde eine etwa gleich gute Reproduzierbarkeit nachgewiesen, wie sie in der oben beschriebenen Macro-Methode innerhalb der ersten 24 Stunden beobachtet wurde. Dies ergaben Untersuchungen enzymhaltiger Kulturüberstände (Bild 4.30), die im Verlauf der Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratzugaben auf die Hydrolyse von BTA-Filmen im Mineralsalzmedium (Kap.4.2.3.2) gewonnen wurden.

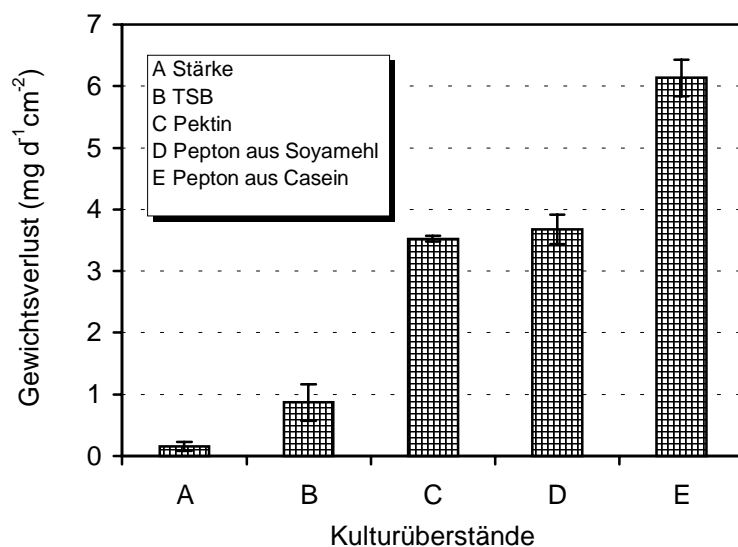


Bild 4.30

Reproduzierbarkeit des Nachweises BTA-hydrolysierender Enzyme mit der Reagenzglas-Methode (Kap.7.4.4.1).

Testansatz (n=3): BTA-Film ( $\varnothing = 0,9$  cm,  $m_a = 9,0 \pm 0,5$  mg), 2 ml Kulturüberstand, 24 h, 55°C, stehend. A - E: Erklärungen siehe Text.

Mit dem Verbrauch von mindestens 1 ml der Enzymlösung war auch die Reagenzglas-Methode ungeeignet für die Untersuchung von Fraktionen, die während der Enzymreinigung anfielen. Sie wurde jedoch für Untersuchungen der BTA-Enzymaktivitäten in Kulturüberständen während des Kulturverlaufes (Kap.4.2.3.5) sowie für die Untersuchung der Substratspezifität des gereinigten Enzyms bezogen auf unterschiedliche Polyesterstrukturen (Kap.4.3.5.7) eingesetzt.



#### 4.3.1.3 UV-Absorptionstest

Bei der Spaltung des BTA-Copolyesters gehen kurze terephthalsäurehaltige Polyesterbausteine in Lösung. Da die Terephthalsäure als aromatische Verbindung Licht im UV-Bereich absorbiert (Absorptionsmaximum: 242 nm), stellt die Messung der Absorptionsänderung einer Lösung, in der BTA-Filme gespalten werden, eine Methode der Aktivitätsbestimmung des Enzyms dar. Die Enzymaktivität wurde aus der Absorptionsänderung pro Zeit, d.h. aus der Steigung des linearen Bereiches der Kurven (meistens zwischen 15 und 60 min), berechnet.

Zur Demonstration der Reproduzierbarkeit dieser Methode ist die Absorptionzunahme während der Hydrolyse kleiner BTA-Filme in Phosphatpuffer durch einen enzymhaltigen, konzentrierten Kulturüberstand in Bild 4.31 dargestellt. Mit dem Einsatz von 50 µl Enzymprobe in einem Reaktionsvolumen von 3 ml wurde wenig Enzymmaterial verbraucht, weshalb diese Methode zur Ermittlung des Temperaturoptimums und der Temperaturstabilität (Kap.4.3.5.5) sowie des pH-Optimums des gereinigten Enzyms (Kap.4.3.5.6) eingesetzt wurde. Die Durchführung dieses Tests wurde mit zunehmender Probenzahl aufwendiger, weshalb er sich für das Screenen von Fraktionen während der Reinigung des BTA-hydrolysierenden Enzyms ebenfalls als ungeeignet erwies.

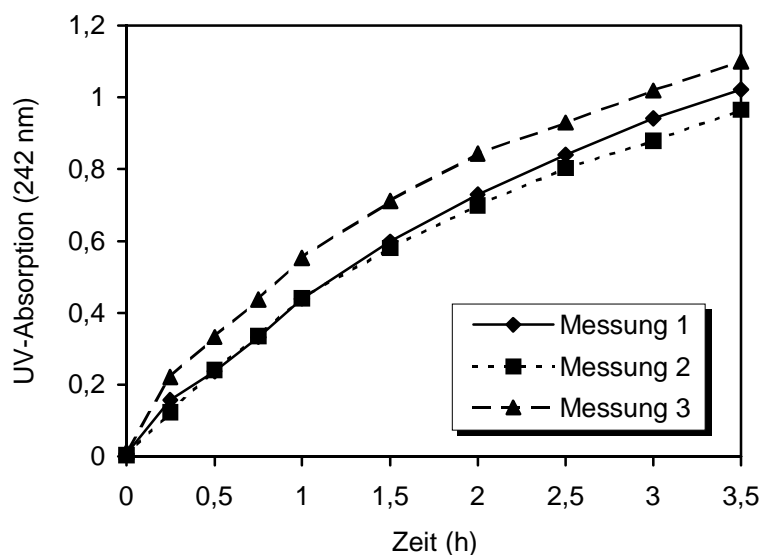


Bild 4.31

Detektion der durch die enzymatische Spaltung des BTA-Copolyesters freiwerdenden Terephthalsäure durch Messung der UV-Absorption.

Dargestellt ist die Dreifachbestimmung einer Probe; Testansatz in Quarzglasküvetten: BTA-Filme (BTA 45/55,  $\varnothing = 0,5$  cm,  $n = 4$ ), 2950 µl 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,1), 50 µl Enzymprobe, 55°C.

#### 4.3.1.4 Titration

Durch die Spaltung von Esterbindungen werden Säuregruppen freigesetzt, die kontinuierlich mit Natronlauge titriert wurden. Wird im Substratüberschuß gearbeitet, ist die Geschwindigkeit der Esterspaltungen, ermittelbar aus dem Laugenverbrauch pro Zeiteinheit, ein direktes Maß der Enzymaktivität. Ein Unit wird dabei definiert als diejenige Enzymmenge, die 1 µmol Substrat in einer Minute unter definierten Bedingungen (Temperatur und pH-

Wert) umzusetzen vermag. Nach STELLMACH et al. (1988, S. 112 und 167) wird die Titration als Standardverfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität von Esterasen (Substrat: Glycerintriacetat) und Lipasen (Substrate: Triglyceride - meist Tributyrin oder Triolein - und Olivenöl) eingesetzt.

Diese Methode wurde zur Charakterisierung des gereinigten BTA-hydrolysierenden Enzyms bezüglich seiner spezifischen Aktivität gegenüber BTA (Kap.4.3.5.4) und der Substratspezifitäten gegenüber verschiedenen Triglyceriden (Kap.4.3.5.8) eingesetzt. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration und die Reproduzierbarkeit der Messungen sind beispielhaft in Bild 4.32 und Bild 4.33 dargestellt.

Für den Nachweis von BTA-Enzymaktivitäten in Reinigungsfraktionen hätte der BTA-Copolyester als Substrat eingesetzt werden müssen, da zunächst unbekannt war, um welche Enzymklasse es sich bei dem BTA-hydrolysierenden Enzym handelte. Eine Untersuchung hätte mehrere Stunden gedauert und da aus apparativen Gründen immer nur eine Probe zur Zeit analysiert werden konnte, wurde auch diese Methode nicht während der Enzymreinigung verwendet.

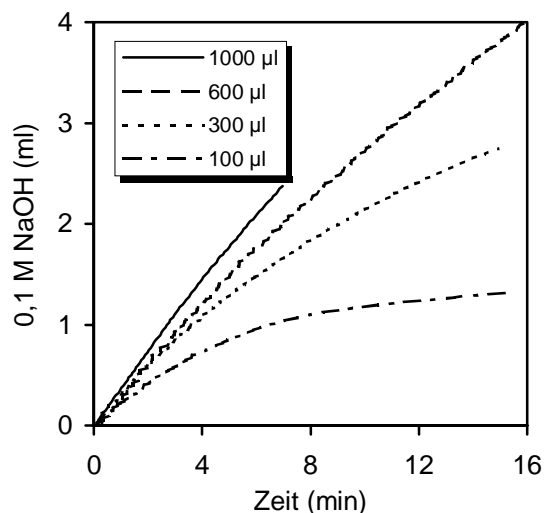


Bild 4.32

Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Konzentration des Tributyrin.

Testansatz: *Pseudomonas*-Lipase (20 µg), 37°C, weiteres siehe Kap.7.4.4.3

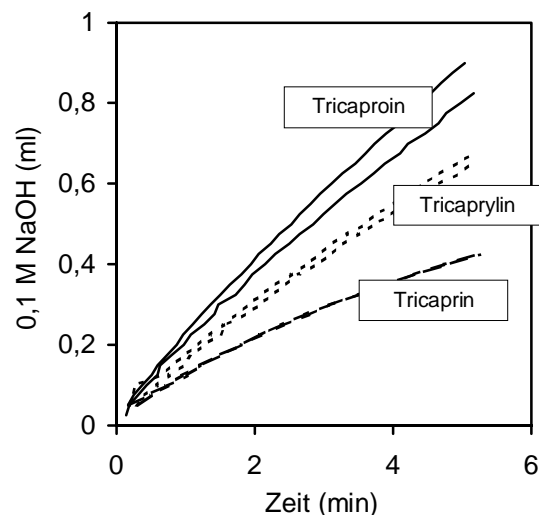


Bild 4.33

Doppelbestimmungen der Titrations dreier verschiedener Triglyceride.

Testansatz: BTA-Hydrolase (20 µg), 55°C, weiteres siehe Kap.7.4.4.3

#### 4.3.1.5 Clear Zone Test

Es war zu Beginn der Arbeit nicht möglich, homogen trübe Polymer-Agarplatten mit dem BTA-Copolyester herzustellen, da die starke Hydrophobizität des Materials immer wieder zur Agglomeration von Kunststoffpartikeln in wässrigen Lösungen führte. Später wurde von der BASF (Ludwigshafen) eine homogene, milchig trübe BTA-Dispersion zur Verfügung gestellt. Durch Einbringen von Verdünnungen dieser BTA-Dispersion in einen gepufferten

Agar ließen sich homogen trübe Agarplatten herstellen. Wurden in ausgestanzte Vertiefungen dieser Agarplatten 30 µl der BTA-aktiven Kulturüberstände hineinpipettiert, so erschienen durch die Spaltung der Polyesterbindungen innerhalb weniger Stunden kreisförmige Aufklarungen um die Probenlöcher herum (Bild 4.34 und Bild 4.35). Ein Vergleich von Aktivitätsmessungen durch die Reagenzglas-Methode und den Clear Zone Test zeigte, daß aufgrund der Ringbreite der Clear Zones erste Schlüsse auf die Höhe der Enzymaktivität in den Proben gezogen werden können (Bild 4.36).

Somit stand ein semiquantitativer Schnelltest für die Enzymreinigung zur Verfügung, der es ermöglichte, gleichzeitig viele Proben mit hoher Selektivität, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit auf BTA-Enzymaktivität zu screenen.

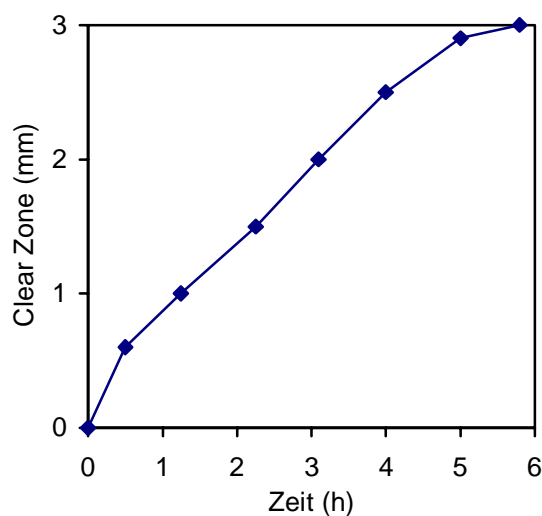


Bild 4.34

Durchmesser von Clear Zones auf BTA-Agarplatten in Abhängigkeit von der Zeit.  
Testansatz (Kap.7.4.4.4): 55°C, 30 µl enzymhaltiger Kulturüberstand.

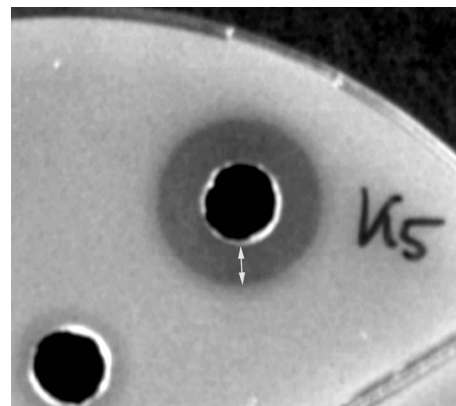


Bild 4.35

Clear Zone auf einer BTA-Agarplatte. Der Pfeil markiert die Ringbreite der Clear Zone, die gemessen wurde.

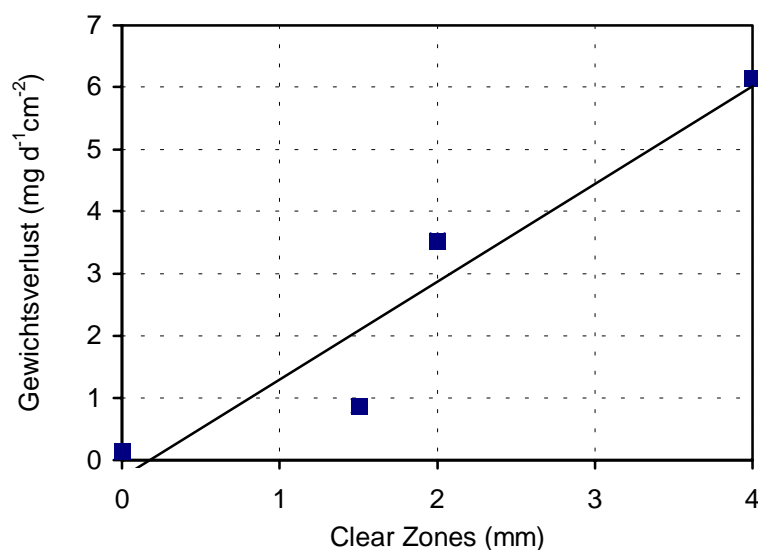


Bild 4.36

Korrelation zwischen der Bildung von Clear Zones und dem Gewichtsverlust von BTA-Filmen.  
Testansatz (Reagenzglas-Methode, Kap.7.4.4.1): siehe Bild 4.30, Proben A, B, C, E.

Testansatz (Clear Zone Test, Kap.7.4.4.4): 55°C, 30 µl der entsprechenden Proben, 18 h.

### 4.3.2 Haltbarkeit der Enzymlösungen

Für die Erhaltung der Enzymaktivität während einer Enzymreinigung und für eine anschließende Lagerung des gereinigten Enzyms ist es wichtig, geeignete Vorkehrungen zur Stabilisierung des Proteins zu treffen. Hierbei hat besonders die Temperatur neben Faktoren wie dem pH-Wert, der Polarität und Ionenstärke des Puffers und der Kontamination mit Schwermetallionen oder Proteasen einen Einfluß auf die Stabilität der Enzyme. Während sich einige Proteine am besten in konzentrierten Lösungen bei 0°C, halten, benötigen andere wiederum Temperaturen von -20 bis -70°C, um aktiv zu bleiben (COOPER 1980, S. 346).

Durch Einfrieren bei -20°C konnte sowohl in Kulturüberständen als auch in gereinigten Enzymproben die BTA-hydrolysierende Aktivität über einen Zeitraum von mehr als 3 Monaten erhalten werden. Dagegen wurde bei Lagerung von Kulturüberständen im Kühlschrank bei + 4°C über einen Zeitraum von 14 Tagen ein Rückgang der Aktivität um 50% beobachtet.

### 4.3.3 Vorversuche für die Reinigung BTA-hydrolysierender Enzyme

#### 4.3.3.1 Konzentrierung der Kulturüberstände

##### Ultrafiltration

In der Literatur (ANDERSSON 1980, SZTAJER und BRYJAK 1989) wird die Ultrafiltration durch Hohlfasermembranen als effektive und wirksame Methode zur Konzentrierung und Reinigung von z.B. lipasehaltigen Lösungen beschrieben. Die Reinigung bezog sich dabei auf die Abtrennung niedermolekularer Verbindungen, die je nach Ausschlußgrenze (cut off) der eingesetzten Membranen abgetrennt werden konnten.

Die Ultrafiltration wurde in einer Amicon-Ultrafiltrationskammer (Volumen: 50 ml, Filtrationsfläche: 47 mm) unter einem Druck von 3 bar durchgeführt. Bei der Filtration durch Flachmembranen mit einem cut off von 10 kDa wurden zu Beginn Flußraten von ca. 0,8 ml/min erreicht, die jedoch innerhalb einer Stunde auf ca. 0,5 ml/min zurückgingen. Die Konzentrierung von einem Liter Kulturüberstand auf das 20fache hätte mit der verfügbaren apparativen Ausrüstung 32 Stunden gedauert, weshalb von dieser Methode für die Konzentrierung großer Volumina Abstand genommen wurde. Die Methode kam aber zum Einsatz, wenn Volumina im 200-ml-Bereich eingeengt werden sollten, und zeigte dabei einen reinigenden Effekt in Bezug auf niedermolekulare Bestandteile wie die Peptone.

### Ammoniumsulfat-Fällung

Eine häufig genutzte Methode zur Proteinkonzentrierung ist die Fällung derselben durch Zugabe anorganischer Salze wie Ammoniumsulfat zu großen Volumina von Rohpräparationen. Wird Ammoniumsulfat in einer wässrigen Proteinlösung gelöst, so bindet eine große Anzahl von Wassermolekülen pro Ammoniumsulfat-Molekül und entsprechend weniger Wasser steht für die Wechselwirkung mit den Proteinen zur Verfügung. Ab einer bestimmten Ammoniumsulfat-Konzentration ist nicht mehr genügend Wasser vorhanden, um eine Reihe von Proteinen in Lösung zu halten, und diese fallen aus (COOPER 1980, S. 348).

Tabelle 4.9 Fällung des BTA-hydrolysierenden Enzyms durch Zugabe von Ammoniumsulfat zu einem enzymhaltigen Kulturüberstand.  
Detektion BTA-hydrolysierender Enzyme: Clear Zone Test (Kap.7.4.4.4).

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Konzentration (% einer gesättigten Lösung)	10	20	30	40	50	60	70
aufgelöstes Präzipitat	(+)	+	++	+++	++++	++++	++++
Überstand	+++	+++	++	++	+	-	-

Ein enzymhaltiger Kulturüberstand wurde in 10 Portionen à 40 ml aufgeteilt, in denen unterschiedliche Ammoniumsulfat-Konzentrationen eingestellt wurden (Kap.7.4.5.2). Nach dem Abtrennen der Präzipitate durch Zentrifugation wurde die Enzymaktivität sowohl in den aufgelösten Präzipitaten als auch im Überstand mittels des Clear Zone Tests untersucht. Wie in Tabelle 4.9 dargestellt ist, präzipitierten BTA-hydrolysierende Enzyme vollständig bei einer Ammoniumsulfat-Sättigung von 50% (Ergebnisse der Lösungen mit 80 bis 100%iger Ammoniumsulfat-Sättigung wurden nicht dargestellt). In nachfolgenden Experimenten wurden deshalb Ammoniumsulfat-Konzentrationen von 50% Sättigung eingestellt.

Die Präzipitate ließen sich weder in 20 mM Citratpuffer (pH 4,4) noch in 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH 9,1) vollständig lösen. Die Suspensionen sahen bräunlich-trüb aus, weshalb sie für die Enzymisolierung mehrfach zentrifugiert, die klaren, enzymhaltigen Überstände jeweils gesammelt und die Pellets erneut gelöst und zentrifugiert wurden. Zum Teil wurden diese klaren, noch leicht gelb gefärbten Lösungen mit Volumina bis zu 200 ml einer Ultrafiltration unterzogen. An den anschließend ungefärbten Proben war zu erkennen, daß die niedermolekularen Peptone (MW < 10 kDa) bei dieser Prozedur abgetrennt wurden.

### **4.3.3.2 Ionenaustauschchromatographie (IEXC)**

#### Bestimmung des Anfangs-pH-Wertes des Puffers

In der Ionenaustauschchromatographie müssen die zu bindenden Substanzen entgegengesetzt zu dem Säulenmaterial geladen sein. Da die Nettoladung eines Proteins vom pH-Wert

abhängig ist, lassen sich Proteine prinzipiell - bei Einstellung entsprechender pH-Werte - sowohl an Anionen- als auch an Kationenaustauscher binden. Voraussetzung für eine sinnvolle Trennung ist dabei die Stabilität des Proteins bei dem entsprechenden pH-Wert (PHARMACIA 1997a).

Für erste Versuche zur Reinigung der BTA-Hydrolase wurde sowohl ein Anionen- (Q-Sepharose) als auch ein Kationenaustauscher (S-Sepharose) gewählt. Beide Materialien sind sogenannte starke Austauscher. Der Begriff „stark“ bezieht sich nicht auf die Festigkeit der elektrostatischen Bindung, sondern auf den sehr breiten pH-Arbeitsbereich dieser Materialien (Q-Sepharose: pH 2-12, S-Sepharose: pH 4-13; PHARMACIA 1997a).

Mit Hilfe eines Batchversuches (Test Tube Method, Kap.7.4.5.6) wurden die pH-Werte der Startpuffer bestimmt, die zur Bindung der BTA-Hydrolase an die Säulenmaterialien führten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.10 zusammengestellt. Wie an der Größe der Clear Zones abzulesen ist, war das BTA-hydrolysierende Enzym über den weiten Bereich von mindestens pH 4 bis pH 9 stabil. Dabei erfolgte eine Bindung der BTA-Hydrolase an die Q-Sepharose (Anionenaustauscher) bei pH-Werten  $\geq 9,0$  und an die S-Sepharose (Kationenaustauscher) bei pH-Werten  $\leq 4,0$ .

Tabelle 4.10 Bestimmung der Startbedingungen (Anfangs-pH-Wert) für die Ionenaustauschchromatographie mit Hilfe der Test Tube Method (Kap.7.4.5.6).

pH-Wert*	ohne Austauscher	Q-Sepharose	S-Sepharose
BTA-Enzymaktivität im Überstand (Clear Zone Test, Kap.7.4.4.4)			
4	+++	n.b.	(+)
5	+++	n.b.	+++
6	+++	+++	+++
7	+++	+++	+++
8	+++	+++	n.b.
9	+++	(+)	n.b.

\* Puffersysteme: Citronensäure/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 4),  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 5 bis 8), Tris/HCl (pH 9)

#### Untersuchung verschiedener Gradientenelutionen

In der Theorie sind zwei generelle Methoden zur Elution der Proteine möglich. Diese sind (a) Änderung des pH-Wertes, was zur Ladungsänderung des Proteins und damit Schwächung der Bindung führt, und (b) eine Steigerung der Ionenstärke, wodurch die Konkurrenz um Bindungsplätze erhöht und damit elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und Säulenmaterial geschwächt werden (SCOPES 1987, S. 110; PHARMACIA 1997a).

Für beide Ionenaustauschmaterialien wurden unterschiedliche Gradientenelutionen getestet und die Trennergebnisse mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese kontrolliert. Die Balken in

den nachfolgenden Diagrammen kennzeichnen BTA-hydrolysierende Aktivität, die durch Untersuchung der Fraktionen mit dem Clear Zone Test detektiert wurde.

#### Anionenaustauscher (Q-Sepharose)

Bei gleichem Startpuffer (20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 9,0) wurden zunächst die Elutionen mit linearem Kochsalzgradienten (Bild 4.37) und linearem pH-Shift (Bild 4.38) von der Q-Sepharose Fast Flow miteinander verglichen.

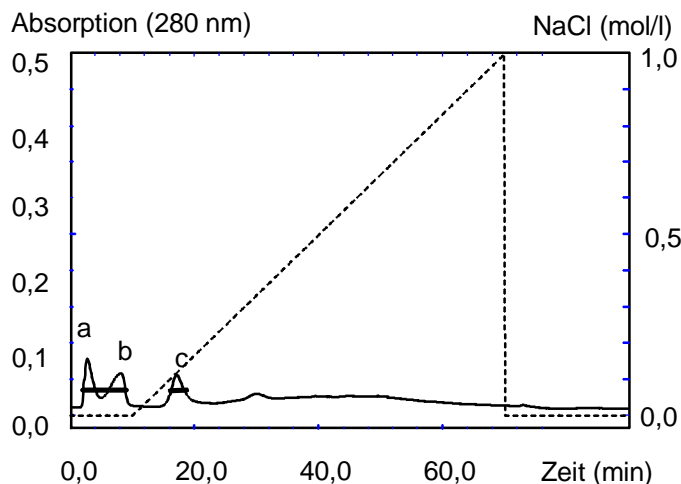


Bild 4.37

Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF.

Start: 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 9,0  
 Elution: 1 M NaCl im Startpuffer, linearer NaCl-Gradient (gestrichelte Linie)  
 Probe: 2 ml Kulturüberstand nach  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung  
 Säulenvolumen: 0,6 ml  
 Flußrate: 0,3 ml/min  
 Fraktionsvolumen: 0,9 ml

waagerechte Balken: Fraktionen mit BTA-Enzymaktivität

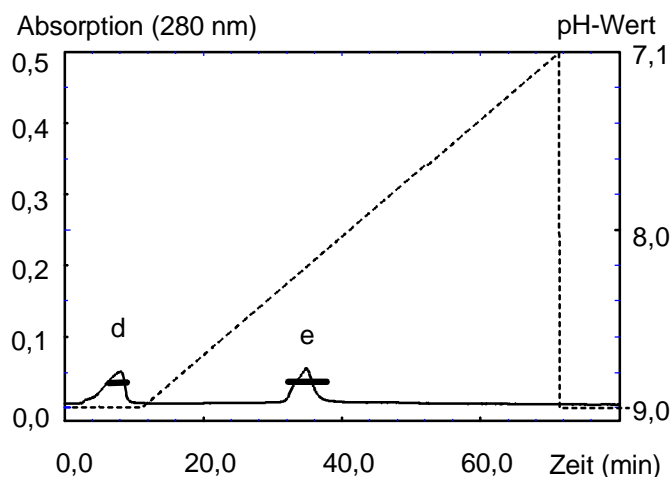


Bild 4.38

Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose FF.

Start: 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 9,0  
 Elution: 20 mM Phosphatpuffer pH 7,1, linearer pH-Shift (gestrichelte Linie)  
 Probe: 2 ml Kulturüberstand nach  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung  
 Säulenvolumen: 0,6 ml  
 Flußrate: 0,3 ml/min  
 Fraktionsvolumen: 0,9 ml

waagerechte Balken: Fraktionen mit BTA-Enzymaktivität

In beiden Versuchen wurden während des Anstiegs der NaCl-Konzentration Proteinpeaks mit BTA-hydrolysierender Aktivität nachgewiesen (Peak „c“ und „e“). Dabei erwies sich die Trennung durch den pH-Shift (Peak e) als erfolgreicher, wie sich durch die Kontrolle der Proben mit SDS-Gelelektrophorese (Bild 4.39) feststellen ließ. Verglichen mit der ursprünglichen Probe (Kulturüberstand nach Ammoniumsulfat-Fällung) und mit den Fraktionen des Peak c, enthalten die Fraktionen des Peak e nur geringfügige Mengen von Proteinen mit Molekulargewichten kleiner als 20 und größer als 30 kDa. Die Proteinbanden zwischen

20 und 30 kDa (besonders die bei ca. 30 kDa) sind angereichert. Eine oder mehrere dieser Banden stellen aufgrund der Ergebnisse aus Kap.4.2.3.5 mit großer Wahrscheinlichkeit die BTA-Hydrolase dar.

Wurde 20mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,0) als Elutionspuffer eingesetzt, konnte keine BTA-aktive Fraktion eluiert werden. Das Enzym wurde unter diesen Bedingungen nicht von dem Säulenmaterial gelöst.

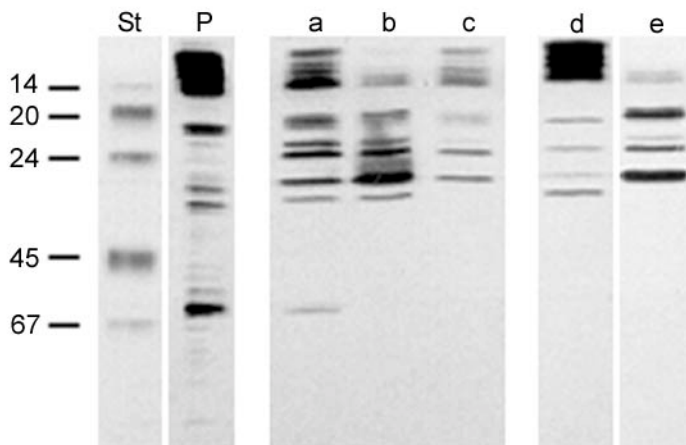


Bild 4.39

Kontrolle der Enzymreinigung durch IEXC mit Q-Sepharose FF mittels SDS-PAGE (Silberfärbung).

Bahnen von links nach rechts:  
St Proteinstandard (Angaben der Molekulargewichte in kDa),  
P aufgetragene Probe,  
a bis e: Proteine der Peakfraktionen a bis e.

Wie an der BTA-Enzymaktivität der Durchbruchpeaks a, b und d zu erkennen ist, wurde in beiden Versuchen das BTA-hydrolysierende Enzym nicht vollständig an das Säulenmaterial gebunden. In weiteren Versuchen reichte eine leichte Erhöhung des Anfangs-pH-Wertes auf pH 9,3 aus, um die BTA-Hydrolase fest an den Träger zu binden, so daß keine BTA-aktiven Durchbruchpeaks mehr auftraten.

#### Kationenaustauscher (UNO-S1)

Als Kationenaustauscher wurde eine UNO-S1-Säule verwendet. Es handelt sich dabei um eine „Continuous-Bed-Säule“, die nach Herstellerangaben eine schnelle, reproduzierbare und hochauflösende Trennung von Biomolekülen bewirkt. Wie die S-Sepharose Fast Flow, mit welcher der Batchversuch zur Bestimmung des Anfangs-pH-Wertes des Puffers durchgeführt wurde, trägt dieses spezielle Säulenbett Sulfonische Gruppen ( $-\text{SO}_3^-$ ). Für die UNO-S1-Säule ist bei einem Säulenbettvolumen von 1,3 ml eine maximale Proteinbeladung mit 20 mg möglich (Lysozym als Testprotein). Enthält die zu reinigende Probe mehr Protein, können aufgrund der einstellbaren hohen Flußraten (bis zu 6 ml/min) mehrere Läufe nacheinander innerhalb kurzer Zeit durchgeführt werden.

Auch mit der UNO-S1-Säule wurde zur Elution der Proteine ein linearer NaCl-Gradient und ein linearer pH-Shift getestet. Als Startpuffer diente in beiden Fällen ein 20 mM Citronensäurepuffer mit einem pH-Wert von 4,0.



Während bei der Durchführung des linearen pH-Shifts mit 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) keine BTA-aktive Fraktion gefunden wurde, was bedeutet, daß das Enzym unter diesen Bedingungen nicht vom Säulenmaterial gelöst werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt), wurde bei Anwendung eines linearen NaCl-Gradienten (Bild 4.40) ein einzelner BTA-aktiver Peak „g“ während des Anstiegs der NaCl-Konzentration detektiert. Die Untersuchung einer Fraktion aus der Mitte dieses Peaks mittels SDS-PAGE zeigte eine Anreicherung der Proteine zwischen 20 und 30 kDa und eine Abreicherung der Proteine kleiner als 20 kDa im Vergleich zur ursprünglichen Probe (Bild 4.41). Die Aktivität der Peakfraktionen (Clear Zone von 4 mm/15h) konnte im Vergleich zur aufgetragenen Probe (Clear Zone von 2 mm/15h) verdoppelt werden.

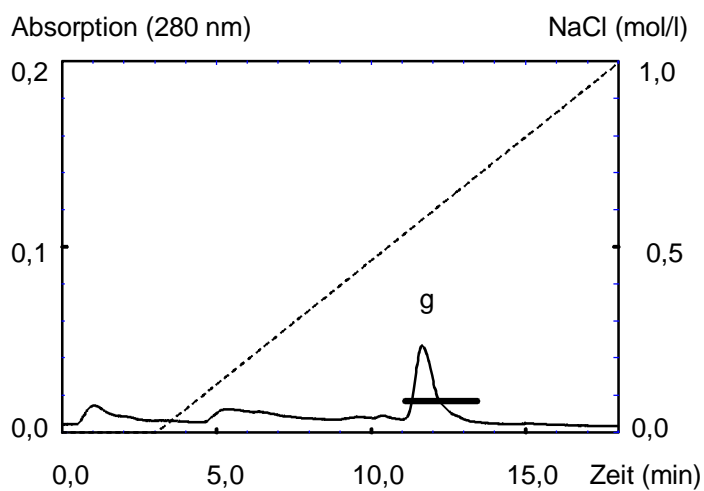


Bild 4.40

Kationenaustauschchromatographie mit Uno-S1.

Start: 20 mM Citratpuffer, pH 4,0  
 Elution: 1 M NaCl im Startpuffer, linearer NaCl-Gradient (gestrichelte Linie)  
 Probe: 2 ml Kulturüberstand nach  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung  
 Säulenvolumen: 1,3 ml  
 Flußrate: 2 ml/min  
 Fraktionsvolumen: 1 ml

waagerechte Balken: Fraktionen mit BTA-Enzymaktivität

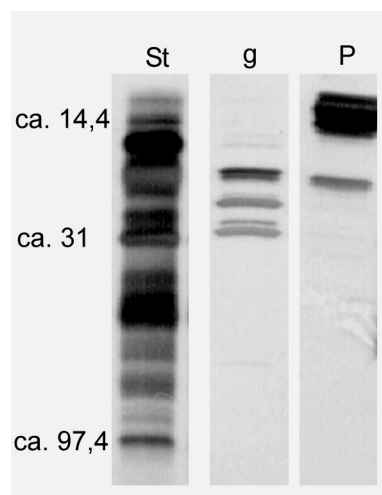


Bild 4.41

Kontrolle der Enzymreinigung durch IEXC mit UNO-S1 mittels SDS-PAGE (Silberfärbung).

Bahnen von links nach rechts:

St Proteinstandard (Angaben der Molekulargewichte in kDa),  
g Fraktion aus der Mitte des Peak g,  
P aufgetragene Probe.

#### Auswahl des Säulenmaterials als Ergebnis vorheriger Untersuchungen

Bei Kontrolle der Proteintrennungen mittels SDS-Gelelektrophorese zeigten beide Säulenmaterialien (Anionen- und Kationenaustauscher) sehr ähnliche Ergebnisse: Es fand jeweils eine Anreicherung der Proteinbanden zwischen 20 und 30 kDa und zufriedenstellende Abreicherungen aller anderen Proteine statt. In beiden pH-Arbeitsbereichen (pH 4 und

pH 9) war das Enzym stabil. Es wurde letztendlich der UNO-S1-Säule der Vorzug gegeben, da mit den höher einstellbaren Flußraten eine schnellere Reinigung höher konzentrierter Proteinlösungen erreicht werden konnte, indem diese notfalls portioniert und in nacheinanderfolgenden Versuchen getrennt wurden.

#### Gesamtprotein-Bilanz einer Trennung mit UNO-S1

Es wurde eine Gesamtprotein-Bilanz für die Chromatographie mit der UNO-S1-Säule aufgenommen, um den Verlust an Protein, das sich unter den gegebenen Bedingungen irreversibel an das Säulenmaterial band, beurteilen zu können. Die aufgetragene Probe war zuvor einer Ammoniumsulfat-Fällung und einer anschließenden Ultrafiltration unterzogen worden. Sie war deutlich weniger gelbbraun gefärbt als andere, nicht ultrafiltrierte Proben nach der Ammoniumsulfat-Fällung.

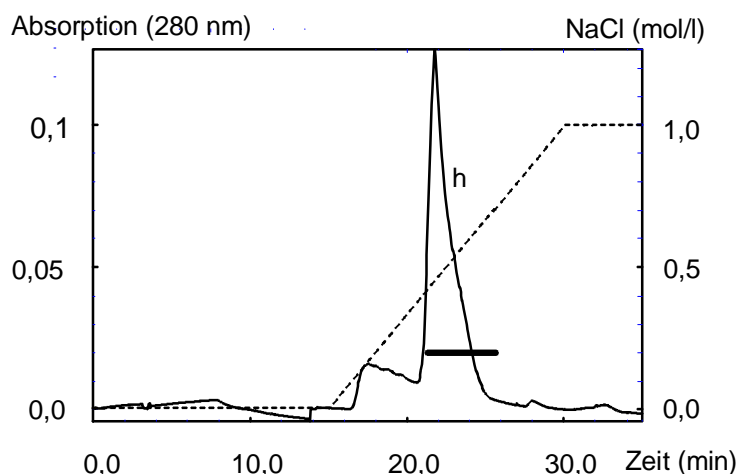


Bild 4.42

Kationenaustauschchromatographie mit UNO-S1.

Start: 20 mM Citratpuffer, pH 4,0  
 Elution: 1 M NaCl im Startpuffer, linearer NaCl-Gradient (gestrichelte Linie)  
 Probe: Kulturüberstand nach Ammoniumsulfat-Fällung und Ultrafiltration, 2,145 mg Protein  
 Säulenvolumen: 1,3 ml  
 Flußrate: 2 ml/min  
 Fraktionsvolumen: 1 ml

waagerechte Balken: Fraktionen mit BTA-Enzymaktivität

Tabelle 4.11 Gesamtprotein-Bilanz der Ionenaustauschchromatographie an einer UNO-S1-Säule mit durch Ammoniumsulfat-Fällung und Ultrafiltration „vorgereinigtem“ Kulturüberstand.

Probe	Volumen (ml)	Protein- konzentration (µg/ml)	Gesamtprotein (µg)	Prozent (%)
aufgetragene Probe	15	143	2145	100
gepoolte BTA-aktive Fraktionen	7	175	1225	57
gepoolter Rest	63	6	378	18
Wiederfindung:			1603	75

Anhand des im Vergleich zu anderen Chromatogrammen sehr niedrigen Durchbruchpeaks in Bild 4.42 läßt sich der Reinigungseffekt der Ammoniumsulfat-Fällung und der anschließenden Ultrafiltration erkennen. Weiterhin wurde ein sehr großer BTA-aktiver Peak „h“

detektiert, der das Ergebnis der Bilanzierung bestätigt (Tabelle 4.11): in den gepoolten BTA-aktiven Fraktionen wurden ca. 57% des anfänglichen Proteins wiedergefunden. Die Probe bestand also bereits vor der Säulenchromatographie zu einem großen Teil aus der BTA-Hydrolase. Mit dieser Methode verblieben ca. 25% des Gesamtproteins auf dem Säulenmaterial.

#### 4.3.3.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

##### Bestimmung der Anfangs-Salzkonzentration des Puffers

In der hydrophoben Interaktionschromatographie ist die Stärke der Proteinbindung an das Säulenmaterial abhängig von der Salzkonzentration des Puffers. Deshalb wurde - ähnlich wie für die Ionenaustauschchromatographie - zunächst in einem Batchversuch (Test Tube Method, Kap.7.4.5.6) getestet, ab welcher Ammoniumsulfat-Konzentration eine Bindung des BTA-hydrolysierenden Enzyms erfolgt. Als Säulenmaterial wurde Phenylsepharose CL-4B gewählt.

Tabelle 4.12 Untersuchung der für die Bindung des BTA-hydrolysierenden Enzyms an die Phenylsepharose CL-4B benötigten Ammoniumsulfat-Konzentration.  
Bestimmung der BTA-Enzymaktivität: Clear Zone Test (Kap.7.4.4.4).

Salzkonzentration	BTA-Enzymaktivität	
	ohne Phenylsepharose CL-4B	nach Inkubation mit Phenylsepharose CL-4B
0 M	++	+
0,5 M	++	(+)
1,0 M	++	(+)
1,5 M	++	(+)

Aus Tabelle 4.12 ist zu ersehen, daß der Salzgehalt keinen negativen Einfluß auf die BTA-Enzymaktivität der Proben hatte (Clear Zones aller Proben: 4,8 mm). Wurden diese Proben mit Phenylsepharose CL-4B inkubiert, so banden etwa zwei Drittel des Enzyms ohne Ammoniumsulfat an das Material (Clear Zone der Probe nach Inkubation mit der Phenylsepharose ohne Salz: 1,3 mm). Eine Konzentration von 0,5 M Ammoniumsulfat war bereits ausreichend, das Enzym nahezu vollständig an das Säulenmaterial zu binden (Clear Zone: 0,4 mm). Eine Erhöhung der Salzkonzentration führte zu keiner Verbesserung des Ergebnisses.

##### Auswahl des Ligendentyps

Von Pharmacia wird ein sogenannter „HIC Media Test Kit“ angeboten, in dem fünf verschiedene HIC-Medien (Phenylsepharose High Performance, Phenylsepharose 6 Fast Flow (low sub) , Phenylsepharose 6 Fast Flow (high sub), Butylsepharose 4 Fast Flow, Octylsepha-

rose 4 Fast Flow), gepackt in kleinen 1-ml-Plastiksäulen, zum Screening für den geeigneten Ligandentyp enthalten sind.

Die verschiedenen Materialien wurden unter gleichen Bedingungen getestet. Als Startpuffer diente 0,5 M Ammoniumsulfat in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1), die Elution erfolgte durch Erniedrigung der Ionenstärke mit einem linearen Gradienten desselben Puffers ohne Ammoniumsulfat und es wurden jeweils 0,5 ml eines durch Ultrafiltration konzentrierten Kulturüberstandes aufgetragen.

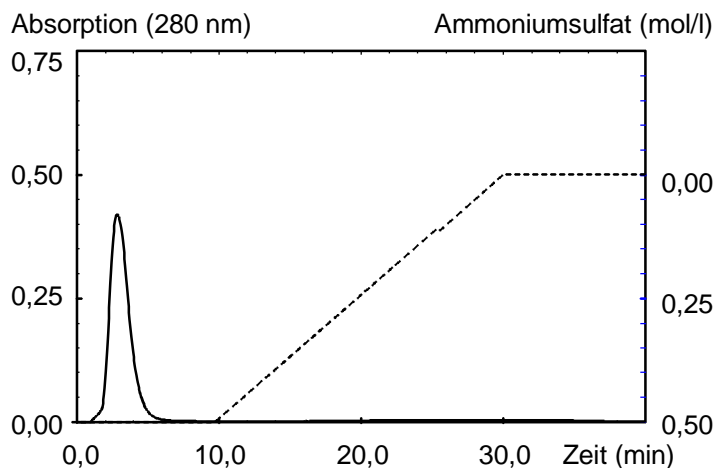


Bild 4.43

HIC mit Phenylsepharose 6 FF (high sub).

Start: 0,5 M Ammoniumsulfat in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1  
 Elution: 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1, linearer Gradient (gestrichelte Linie)  
 Probe: 0,5 ml durch Ultrafiltration konzentrierter Kulturüberstand  
 Säulenvolumen: 1,0 ml  
 Flußrate: 0,5 ml/min  
 Fraktionsvolumen: 0,5 ml

Die Chromatogramme mit allen fünf getesteten Säulenmaterialien sahen identisch aus. In Bild 4.43 wird beispielhaft das Chromatogramm an der Phenylsepharose 6 FF dargestellt. Der große, nicht BTA-aktive Durchbruchpeak verspricht eine gute Abtrennung von Verunreinigungen, doch wurde auch in den nachfolgenden Fraktionen keine BTA-Enzymaktivität detektiert. Das BTA-hydrolysierende Enzym band demnach an alle fünf getesteten Säulenmaterialien so stark, daß eine Verminderung der Ionenstärke nicht mehr ausreichte, um das Enzym zu eluieren.

Die Elutionsbedingungen lassen sich durch Zugabe geringer Konzentrationen wasserlöslicher organischer Lösungsmittel (Alkohole) zu dem Elutionspuffer verschärfen. Diese Lösungsmittel setzen die Polarität und die Oberflächenspannung des Elutionspuffers herab, was zu einer Schwächung der Protein-Liganden-Wechselwirkungen und somit zu einer verbesserten Ablösung der gebundenen Proteine von dem Säulenmaterial führt (PHARMACIA 1997b). Voraussetzung für eine derartige Anwendung ist, daß das Zielprotein gegenüber den eingesetzten Lösungsmitteln stabil ist. Oftmals werden 40% Ethylenglykol oder 30% Isopropanol in salzfreiem Puffer verwendet.

Da Isopropanol die physikalischen Eigenschaften des Wassers noch stärker verändert als Ethylenglykol (Tabelle 4.13), wurde die Stabilität des BTA-hydrolysierenden Enzyms gegenüber diesem Lösungsmittel getestet.

Lösungsmittel	Viskosität (mPa s)	Dielektrische Konstante	Oberflächen- spannung (mN/cm)
Wasser	0,89	78,3	0,720
Ethylenglykol	16,9	40,7	0,467
Isopropanol	2,0	20,33	0,237

Tabelle 4.13

Physikalische Eigenschaften verschiedener Lösungsmittel bei 25°C (PHARMACIA 1997b).

Eine Enzymlösung wurde dazu mit unterschiedlichen Anteilen Isopropanol versetzt und die Aktivität im Clear Zone Test (Kap.7.4.4.4) geprüft. Die Ergebnisse in Tabelle 4.14 zeigen, daß selbst eine Isopropanol-Konzentration von 30% die BTA-Enzymaktivität nicht beeinträchtigt. Da der Clear Zone Test über einen Zeitraum von 12 Stunden bei 55°C verlief, ist auszuschließen, daß das Enzym während der Durchführung der hydrophoben Interaktionschromatographie (max. 3 h bei Raumtemperatur) geschädigt wird.

Tabelle 4.14 Einfluß von Isopropanol auf die Aktivität des BTA-hydrolysierenden Enzyms.  
Bestimmung der BTA-Enzymaktivität: Clear Zone Test (Kap.7.4.4.4)

Isopropanol	0%	5%	10%	15%	20%	25%	30%
BTA-Enzymaktivität	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Die fünf Probensäulen mit den unterschiedlichen Liganden (Pharmacia Test Kit) wurden daraufhin erneut, jedoch mit anderem Elutionspuffer (30% Isopropanol in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1) getestet. Mit dem neuen Puffer konnten von allen fünf Säulenmaterialien BTA-aktive Fraktionen eluiert werden. Da sich die Chromatogramme erneut ähnelten, wird in Bild 4.44 wieder nur beispielhaft das Chromatogramm mit der Phenylsepharose 6 FF dargestellt.

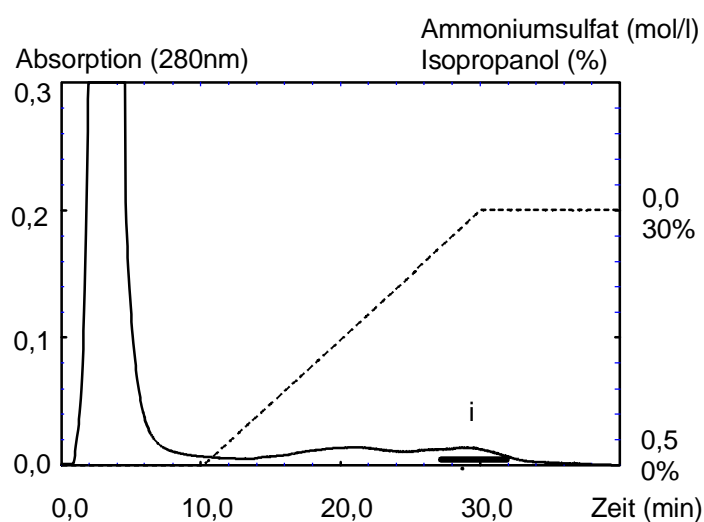


Bild 4.44

HIC mit Phenylsepharose 6 FF (high sub).

Start: 0,5 M Ammoniumsulfat in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1  
Elution: 30% Isopropanol in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1, linearer Gradient (gestrichelte Linie)  
Probe: 0,5 ml mittels Ultrafiltration konzentrierter Kulturüberstand  
Säulenvolumen: 1,0 ml  
Flußrate: 0,5 ml/min  
Fraktionsvolumen: 1 ml

waagerechte Balken: Fraktionen mit BTA-Enzymaktivität

Neben dem großen, aktivitätsfreien Durchbruchpeak wurden weitere kleine Peaks während der Steigerung der Isopropanolkonzentration eluiert. In Fraktionen des Bereiches „i“ wurde BTA-Enzymaktivität im Clear Zone Test (Kap.7.4.4.4) nachgewiesen. Wie schon in Bezug auf die Größe und Lage des BTA-aktiven Peaks gab es auch bezüglich der Proteinkonzentration und der hohen Reinheit der Proben nur geringfügige Unterschiede zwischen den verschiedenen Liganden. Die Kontrolle mittels der SDS-Gelelektrophorese zeigte für alle Säulenmaterialien eine angereicherte Bande bei ca. 30 kDa (Bild 4.45). Weitere Proteine waren nur noch in Spuren vorhanden.

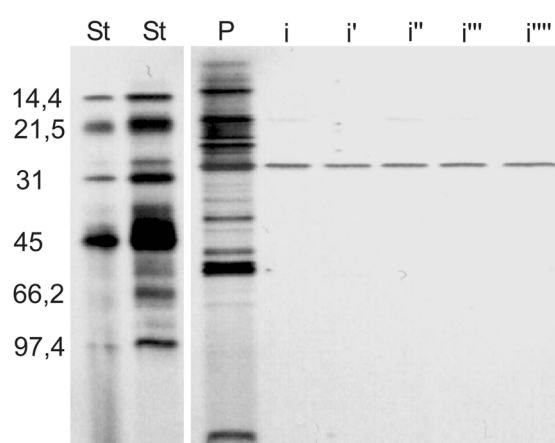


Bild 4.45

Kontrolle der Enzymreinigung durch HIC mit den Säulen des „HIC Media Test Kit“ mittels SDS-PAGE (Silberfärbung).

Bahnen von links nach rechts:

St (2x) zwei verschiedene Konzentrationen eines Proteinstandards (Angaben der Molekulargewichte in kDa),

P aufgetragene Probe,

i bis i''': BTA-aktive Bereiche der HICs mit den Säulen des „HIC Media Test Kit“ (v.l.n.r.: Phenylsepharose 6 FF (high sub), Phenylsepharose High Performance, Phenylsepharose 6 FF (low sub), Butylsepharose 4 FF, Octylsepharose 4 FF).

Das gleichartige Verhalten des Enzyms gegenüber den unterschiedlichen Liganden ließ vermuten, daß bei der Bindung des Enzyms an das Material nicht hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Enzym und Liganden im Vordergrund standen, sondern vielmehr ein Aussalzungseffekt, der auch mit dem Träger allein, der Sepharose, funktionieren müßte. Deshalb wurde eine Säule mit dem Sepharose-Trägermaterial (ohne Liganden) gepackt und eine enzymhaltige Probe über diese Säule gegeben. Zur Verstärkung des eventuell vorhandenen Aussalzungseffektes wurde die Ammoniumsulfat-Konzentration der Probe und des Startpuffers von 0,5 M auf 1,0 M erhöht. Die Versuchsbedingungen und das Chromatogramm werden in Bild 4.46 dargestellt.

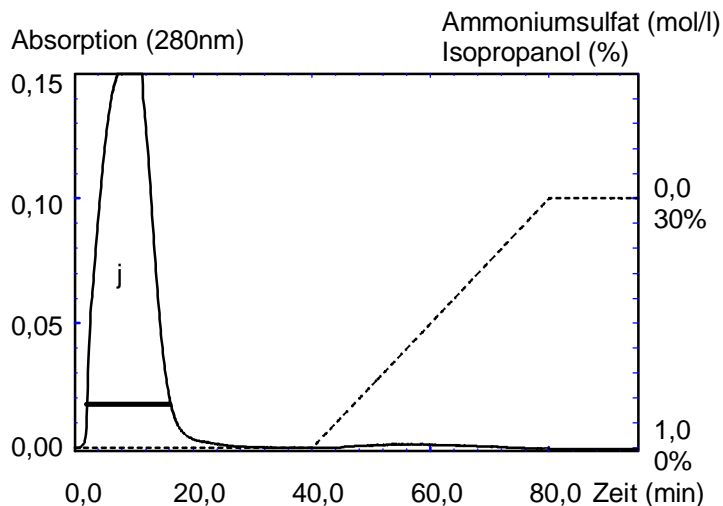


Bild 4.46

Chromatographie mit der reinen Sepharose.

Start: 1 M Ammoniumsulfat in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1  
 Elution: 30% Isopropanol in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1, linearer Gradient (gestrichelte Linie)  
 Probe: 3,4 ml Kulturüberstand nach  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung  
 Säulenvolumen: 1,14 ml  
 Flußrate: 0,3 ml/min  
 Fraktionsvolumen: 0,9 ml

waagerechte Balken: Fraktionen mit BTA-Enzymaktivität

Es wurde hohe BTA-Enzymaktivität im Durchbruchpeak „j“ gemessen. Unterhalb des Isopropanolgradienten wurden keine BTA-aktiven Fraktionen gefunden. Es lag also kein Aussalzungseffekt vor. Das Enzym benötigt für die Bindung das Vorhandensein eines hydrophoben Liganden.

Aufgrund der guten Ergebnisse mit allen fünf getesteten Liganden stand die Wahl des Materials frei. Im Weiteren wurde eine mit Phenylsepharose CL-4B selbstgepackte Säule eingesetzt. Dieses Material entspricht - abgesehen von dem Vernetzungsgrad der Agarose (4% anstelle von 6%) - der Phenylsepharose 6 Fast Flow in der Partikelgröße und dem Substitutionsgrad.

#### Optimierung der HIC an Phenylsepharose CL-4B

Um das BTA-hydrolysierende Enzym in noch konzentrierter Form gewinnen zu können, wurde die Elution der Proteine mittels Stufengradienten getestet. Hierzu müssen die Konzentrationen bestimmt werden, (a) bei denen das Zielprotein gerade noch bindet, schwächer bindende Kontaminanten jedoch eluiert werden, und (b) bei denen das Zielprotein gerade eluiert wird, stärker bindende Kontaminanten jedoch noch auf der Säule bleiben.

Als Anhaltspunkt für den Aufbau des Stufengradienten wurde das Chromatogramm mit der Phenylsepharose CL-4B mit linearem Isopropanolgradienten zugrunde gelegt (Bild 4.47), bei dem der BTA-aktive Peak zwischen 18 und 25,5% Isopropanol eluierte (Peakspitze bei ca. 21% Isopropanol). Bei Austestung des Stufengradienten wurden gute Ergebnisse mit einer Vorstufe von 9% Isopropanol und einer anschließenden Elution des Zielproteins bei 25,5% Isopropanol erhalten (Bild 4.48). Das Volumen der BTA-aktiven Fraktionen wurde mit dem Stufengradienten von 4,5 ml (Peakelution über 15 min) auf 2,7 ml (Peakelution über 9 min) reduziert.

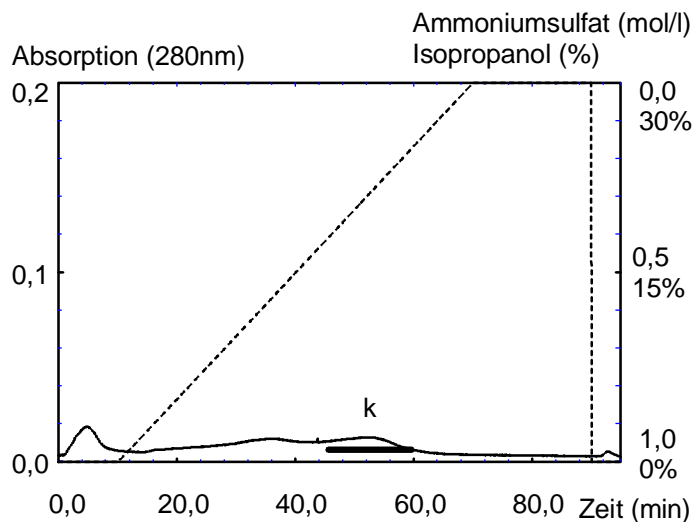


Bild 4.47

HIC an der Phenylsepharose CL-4B mit linearem Isopropanolgradienten.

Start: 0,5 M Ammoniumsulfat in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1  
 Elution: 30% Isopropanol in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1 (gestrichelte Linie)  
 Probe: 1,2 ml Kulturüberstand nach  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung  
 Säulenvolumen: 1,14 ml  
 Flußrate: 0,3 ml/min  
 Fraktionsvolumen: 0,9 ml

waagerechte Balken: Fraktionen mit BTA-Enzymaktivität

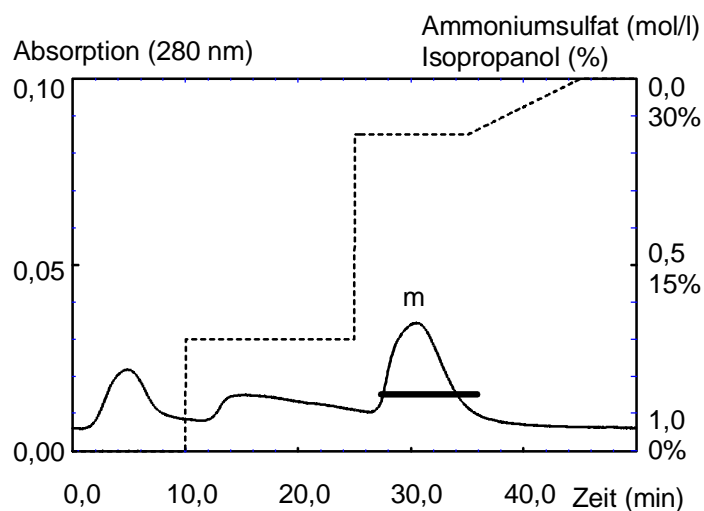


Bild 4.48

HIC an der Phenylsepharose CL-4B mit Isopropanol-Stufengradienten.

Start: 0,5 M Ammoniumsulfat in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1  
 Elution: 30% Isopropanol in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1 (gestrichelte Linie)  
 Probe: 1,2 ml Kulturüberstand nach  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung  
 Säulenvolumen: 1,14 ml  
 Flußrate: 0,3 ml/min  
 Fraktionsvolumen: 0,9 ml

waagerechte Balken: Fraktionen mit BTA-Enzymaktivität

### Gesamtprotein-Bilanz einer Trennung mit Phenylsepharose CL-4B

Analog zur Chromatographie mit der UNO-S1-Säule wurde auch für die Chromatographie mit Phenylsepharose CL-4B eine Gesamtprotein-Bilanz aufgenommen, um den Verlust an Protein, das sich unter den gegebenen Bedingungen irreversibel an das Säulenmaterial band, beurteilen zu können. In Bild 4.49 wird das Chromatogramm und in Tabelle 4.15 die Proteinbilanz desselben dargestellt.



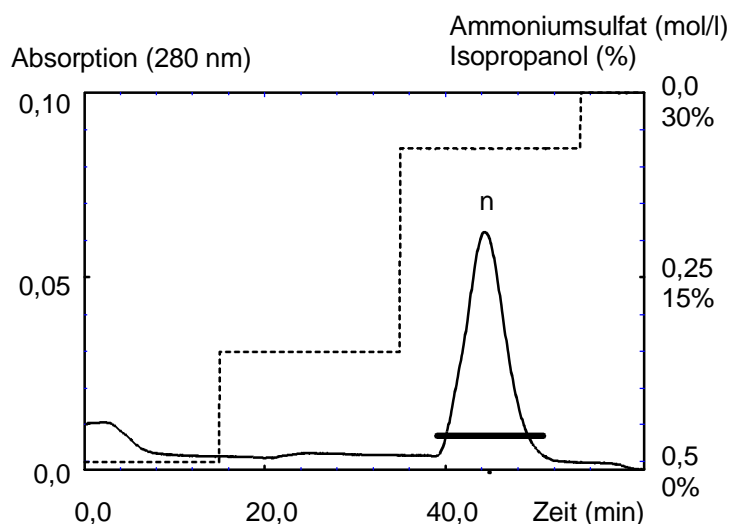


Bild 4.49

HIC an der Phenylsepharose CL-4B.

Start: 0,5 M Ammoniumsulfat in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1  
 Elution: 30% Isopropanol in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1, Stufengradient. (gestrichelte Linie)  
 Probe: 4,7 ml einer an UNO-S1 gereinigten Probe  
 Säulenvolumen: 1,14 ml  
 Flußrate: 0,3 ml/min  
 Fraktionsvolumen: 0,9 ml

waagerechte Balken: Fraktionen mit BTA-Enzymaktivität

Tabelle 4.15 Gesamtprotein-Bilanz der HIC an der Phenylsepharose CL-4B (Bild 4.49) mit über die UNO-S1-Säule vorgereinigter Probe.

Probe	Volumen (ml)	Protein- konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Gesamtprotein ( $\mu\text{g}$ )	Prozent (%)
aufgetragene Probe	4,7	25	116	100
gepoolte BTA-aktive Fraktionen	3,6	10	35	30
gepoolter Rest	19,8	1	20	17
Wiederfindung:			55	47

Anhand der Proteinwiederfindung von nur 47% wird deutlich, daß die Elutionsbedingungen noch weit von einer Optimierung entfernt sind, da nach PHARMACIA (1997b) eine Wiederfindung von mindestens 75% erreicht werden sollte. Andererseits ist die Abtrennung von ca. 20  $\mu\text{g}$  kontaminierendem Protein, d.h. 36% bezogen auf die wiedergefundene Proteinmenge (55  $\mu\text{g}$ ), ein Hinweis auf die hohe Selektivität dieser Methode.

Das Chromatogramm (Bild 4.49) beginnt nicht mit einer Nulllinie, da der Lauf während des Probenauftrages kurzzeitig unterbrochen und anschließend neu gestartet werden mußte. Die zuvor eluierten Proben wurden gesammelt und in die Proteinbilanz mit einbezogen.

#### 4.3.4 Ergebnis der Enzymreinigung

##### 4.3.4.1 Beschreibung der Reinigung der BTA-Hydrolase

Die Tabelle 4.16 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der wichtigsten Reinigungsschritte. Während der Reinigung wurde die BTA-Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen mit Hilfe des Clear Zone Tests (Kap.7.4.4.4) kontrolliert. Von jeder Probe wurde ein Aliquot bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und von diesen Aliquots wurde, nachdem die Natur der BTA-Hydro-

lase als Lipase erkannt war (Kap.4.3.5.3), nachträglich die Lipaseaktivität durch Titration mit Tributyrin als Substrat ermittelt. Die Reinigung der Probe wurde mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (Bild 4.50) verfolgt.

Nach der Kultivierung von *Thermomonospora fusca* DSM 43793 über 18 Stunden (Kap.7.4.5.1) waren in 1,6 Litern des durch Zentrifugation gewonnenen Kulturüberstandes ca. 5,5 g Protein enthalten (Tabelle 4.16). Dieser Wert spiegelt vor allem den schon zu Beginn der Kultur im MSV/Pepton(0,5%ig)-Medium vorhandenen Proteingehalt von ca. 4600 µg/ml wieder.

Die Ammoniumsulfat-Fällung diente als erster Reinigungsschritt vorwiegend der Konzentrierung der Probe. Wie schon in Kap.4.3.3.1 beschrieben, konnte das Präzipitat bei weitem nicht vollständig gelöst werden. Nach der Ammoniumsulfat-Fällung waren nur noch 30 mg des ursprünglich vorhandenen Proteins zu finden. Der Anstieg der spezifischen Enzymaktivität um das 29fache auf 97 U/mg zeigt, daß neben der Konzentrierung auch eine gute Reinigung stattfand. Das Absinken der Ausbeute auf 37% weist aber auf einen großen Enzymverlust hin.

Tabelle 4.16 Zusammenfassung der Ergebnisse der Enzymreinigung.  
Bestimmung der Lipaseaktivität: Titration mit Tributyrin als Substrat (Kap.7.4.4.3).

Reinigungsschritt	GV (ml)	GP (mg)	GLA (U)	SLA (U/mg)	Ausbeute (%)
Kulturüberstand	1600	5520	18133	3,3	100
Ammoniumsulfat-Fällung	107	70	6777	97	37
UNO-S1 (IEXC)	42	21	4584	218	25
Phenylsepharose CL-4B (HIC)	9,5	7	2521	360	14

GV Gesamtvolumen, GP Gesamtprotein, GLA Gesamt-Lipaseaktivität, SLA Spezifische Lipaseaktivität, Ausbeute =  $GLA \times 100 / 18133$  U.

Im nächsten Trennschritt wurden mit der Ionenaustauschchromatographie an der UNO-S1-Säule zufriedenstellende Ergebnisse sowohl in Bezug auf die Reinigung (spezifische Lipaseaktivität von 218 U/mg) als auch auf die Ausbeute (25%) erreicht. Das SDS-Gel zeigte jedoch noch das Vorhandensein mehrerer Proteinbanden an (

Bild 4.50, Bahn „3“). Durch die hohe Selektivität der Phenylsepharose CL-4B für das BTA-hydrolysierende Enzym wurde eine Probe von 9,5 ml erhalten, die über eine sehr hohe spezifische Enzymaktivität von 360 U/mg, d.h. dem 100fachen des Anfangswertes verfügte. Die Reinheit der Probe wurde durch die SDS-Gelelektrophorese bestätigt. Es wurde eine Hauptbande isoliert, die mit in Spuren vorhandenen Proteinbanden, deren Molekulargewicht knapp oberhalb von 20 kDa lag, kontaminiert war. Die Ausbeute von 14% bezogen auf die im Kulturüberstand gemessene Lipaseaktivität stellt ein zufriedenstellendes Ergebnis dar.

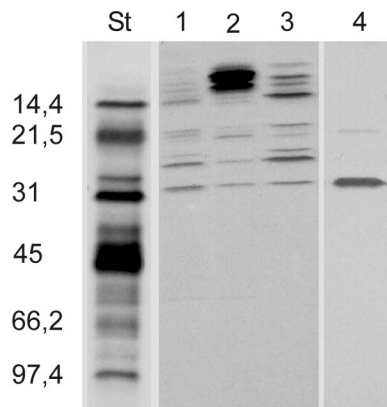


Bild 4.50

Kontrolle der Enzymreinigung mittels SDS-PAGE (Silberfärbung).

Bahnen von links nach rechts:

St Proteinstandard (Angaben in kDa),

2 Kulturüberstand,

3 Probe nach Ammoniumsulfat-Fällung,

1 Probe nach IEXC (UNO-S1),

4 Probe nach HIC (Phenylsepharose CL 4B).

#### 4.3.4.2 Aktivitätsnachweis des isolierten Proteins

Mit zunehmender Reinigung reicherte sich eine Proteinbande bei ca. 30 kDa im SDS-Gel an. Sie konnte jedoch nicht als alleinige Bande isoliert werden. Ein bis drei weitere Proteinbanden waren - wenn auch nur in Spuren - im silbergefärbten Gel zu erkennen. Um die BTA-Enzymaktivität der angereicherten Hauptbande bei 30 kDa definitiv zuordnen zu können, wurde die gereinigte Enzymprobe zweifach in nebeneinanderliegende Taschen eines nativen Polyacrylamid-Gels pipettiert und durch Elektrophorese getrennt. Das native Gel wurde anschließend zwischen den beiden Probeauftragungen geteilt. Die eine Hälfte wurde mit Coomassie-Blau gefärbt, während die zweite Hälfte zur Trennung der einzelnen Banden in kleine Abschnitte à 4 - 5 mm zerschnitten wurde. Die einzelnen Abschnitte wurden auf eine homogen trübe BTA-Agarplatte gelegt.

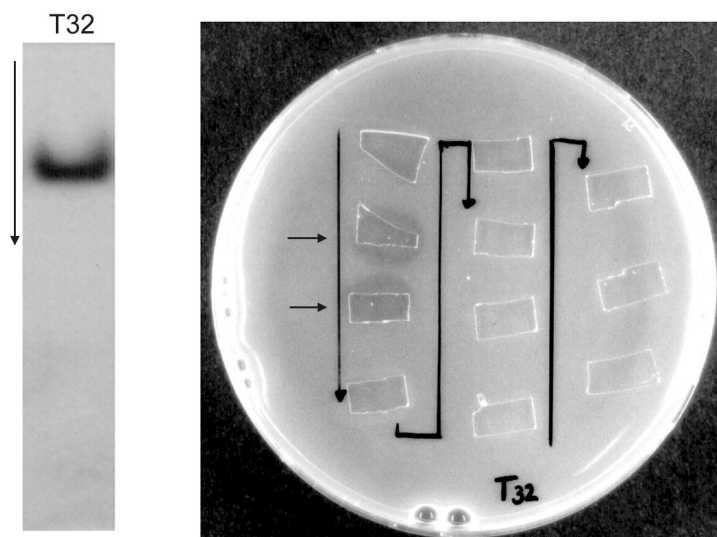


Bild 4.51

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Detektion der BTA-aktiven Bande.

Links: Coomassie-Blau gefärbtes Gel; der Pfeil markiert die Richtung, in der die andere Hälfte des Gels zerschnitten und auf die BTA-Agarplatte gelegt wurde.

Rechts: Nachweis der BTA-Enzymaktivität der Hauptbande durch Hydrolyse des im Agar suspendierten BTA-Copolyesters (kleine Pfeile markieren Clear Zones).

Nach einer Inkubation von 12 Stunden bei 55°C konnte durch Aufklärung des Agars genau die Stelle als „BTA-hydrolysierend“ identifiziert werden, an der die konzentrierte Proteinbande im Coomassie-Blau gefärbten Gel erschien (Bild 4.51). Damit war der Beweis für die

Anreicherung der BTA-Hydrolase erbracht. Bei den anderen Proteinbanden mit Molekulargewichten zwischen 21 und 31 kDa handelt es sich aufgrund des fehlenden Aktivitätsnachweises offensichtlich um nicht BTA-aktive Verunreinigungen.

### 4.3.5 Charakterisierung der gereinigten BTA-Hydrolase

#### 4.3.5.1 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird häufig zur Bestimmung von Molekulargewichten monomerer Enzyme oder der Untereinheiten oligomerer Enzyme herangezogen. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet stark an Proteine und denaturiert sie. Im Überschuß an SDS binden etwa 1,14 g des Detergens pro Gramm Protein, so daß alle Proteine eine beständige negative Ladung pro Masseneinheit tragen und während der Elektrophorese zur Anode wandern. Infolge der Molekularsiebeigenschaften des Gels sind die Strecken, die die Protein-SDS-Komplexe in einer bestimmten Zeit wandern, dem dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte umgekehrt proportional (WILSON und GOULDING 1990, S. 321).

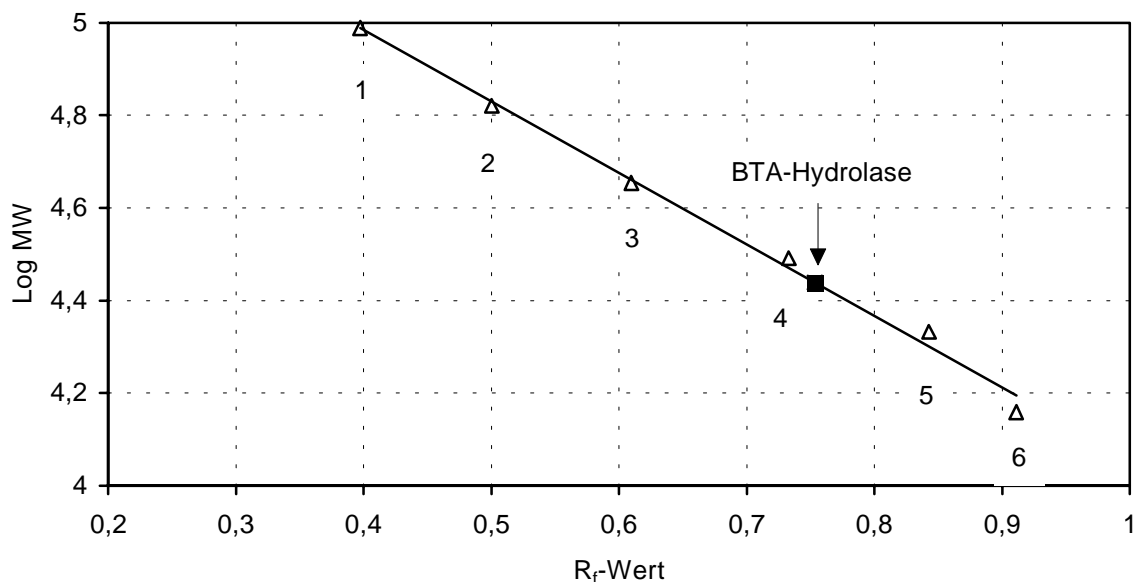


Bild 4.52 Kalibriergerade zur Bestimmung des Molekulargewichtes der BTA-Hydrolase. Markerproteine siehe Tabelle 4.17.

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach Kap.7.4.6.1 durchgeführt. Aufgrund der Kalibriergeraden (Bild 4.52), die mit definierten Markerproteinen (Tabelle 4.17) erstellt wurde, ließ sich für die BTA-Hydrolase (Bahn 4, Bild 4.53) ein Molekulargewicht von ca. 27,44 kDa ermitteln.

Tabelle 4.17

Zusammensetzung des Proteinstandards (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, low range) zur Bestimmung des Molekulargewichtes der BTA-Hydrolase.

Nr.	Markerproteine	Molekulargewicht (Da)
1	Phosphorylase B	97400
2	Serumalbumin	66200
3	Ovalbumin	45000
4	Carboanhydrase	31000
5	Trypsin-Inhibitor	21500
6	Lysozym	14400

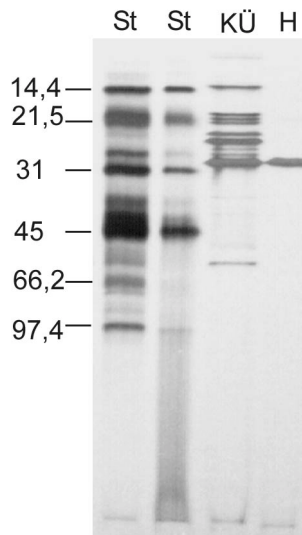


Bild 4.53

SDS-PAGE zur Bestimmung des Molekulargewichtes, Silberfärbung.

St (2x) Proteinstandard (Angaben der Molekulargewichte in kDa),  
KÜ Kulturüberstand nach  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung,  
H gereinigte BTA-Hydrolase.

#### 4.3.5.2 Bestimmung des isoelektrischen Punktes der BTA-Hydrolase

Proteine sind sogenannte Ampholyte, d.h. sie besitzen positiv und negativ geladene Gruppen. Ihre Nettoladung, die Summe der positiven und negativen Ladungen, ist abhängig vom pH-Wert der Umgebung. Für jedes Protein existiert in Abhängigkeit von seiner Aminosäurezusammensetzung ein ganz bestimmter pH-Wert, bei dem seine Nettoladung gleich Null ist. Er wird als „Isoelektrischer Punkt“ (pI-Wert) des Proteins bezeichnet (COOPER 1987, S. 126-128).

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wird in einem Polyacrylamid-Gel mit Hilfe von niedermolekularen Trägerampholyten ein stabiler pH-Gradient erzeugt, innerhalb dessen sich die Proteine entsprechend ihres pI-Wertes fokussieren. Durch Erstellung einer Kalibriergeraden mit definierten Markerproteinen lassen sich die pI-Werte von Proteinen graphisch ermitteln.

In Bild 4.55 ist die BTA-Hydrolase als einzelne Proteinbande im Ampholine Polyacrylamid-Gel zu erkennen. Anhand der Kalibriergeraden (Bild 4.54) ließ sich ihr pI-Wert im leicht sauren Bereich bei pH 6,43 ermitteln. Ein durch die Silberfärbung hervorgerufener Artefakt verdeckt die Bande des Markerproteins 8 (Lectin, saure Bande, Tabelle 4.18).

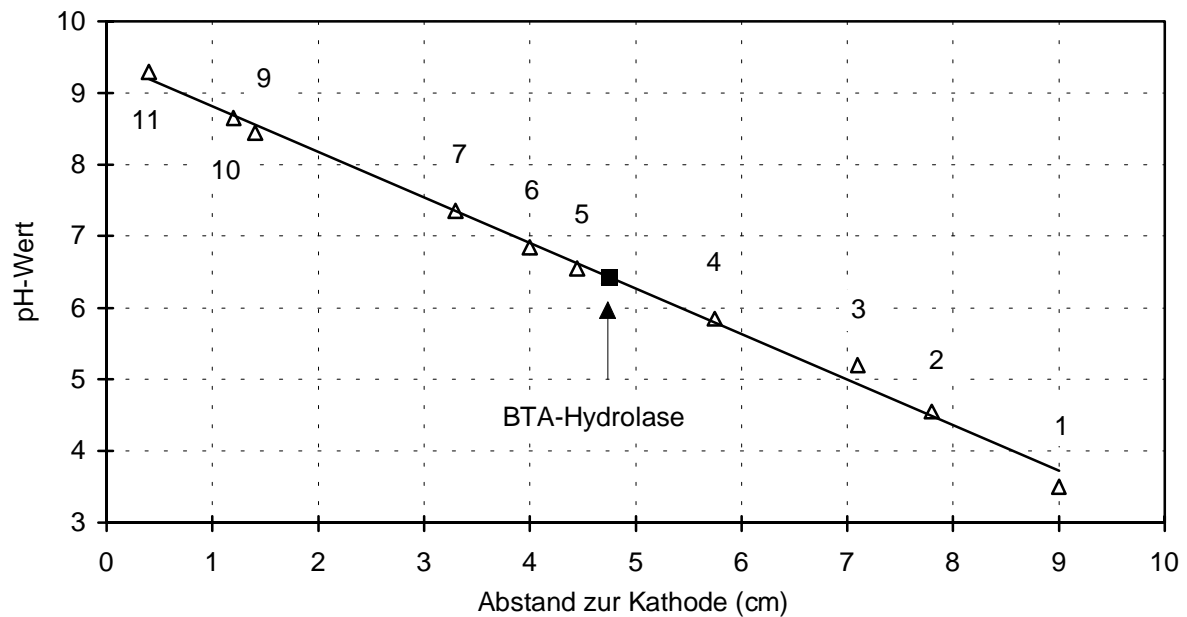


Bild 4.54 Kalibriergerade zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes der BTA-Hydrolase. Markerproteine (offene Dreiecke) siehe Tabelle 4.18.

Tabelle 4.18

Zusammensetzung des Proteinstandards (Broad pI Calibration Kit, pH 3-10) zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes der BTA-Hydrolase.

Nr.	Markerproteine	pI-Wert
1	Amyloglucosidase	3,50
2	Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	4,55
3	$\beta$ -Lactoglobulin A	5,20
4	Carboanhydrase B (Rind)	5,85
5	Carboanhydrase B (Mensch)	6,55
6	Myoglobulin, saure Bande (Pferd)	6,85
7	Myoglobulin, basische Bande (Pferd)	7,35
8	Lectin, saure Bande (Lens culinaris)	8,15
9	Lectin, mittlere Bande (Lens culinaris)	8,45
10	Lectin, basische Bande (Lens culinaris)	8,65
11	Trypsinogen	9,30

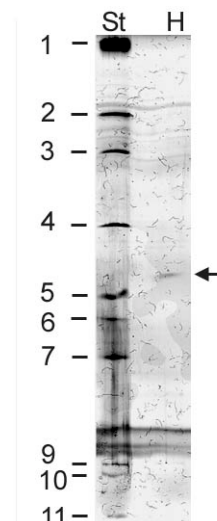


Bild 4.55

Ampholine PAGplate (pH 3,5-9,5) zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes der BTA-Hydrolase, Silberfärbung.

St Proteinstandard (siehe Tabelle 4.18),  
H BTA-Hydrolase.

#### 4.3.5.3 Aminosäurezusammensetzung und -sequenz der BTA-Hydrolase

Zur Identifizierung der BTA-Hydrolase wurde ihre N-terminale Aminosäuresequenz über den Edman-Abbau bestimmt (Kap.7.4.7). Die erhaltene N-terminale Sequenz wurde mit Aminosäuresequenzen bereits beschriebener Enzyme aus der SP-TREMBL Datenbank (Release 7.0, 08/1998) verglichen. Dabei wurden innerhalb eines Bereiches von ca. 20 Aminosäuren Sequenzhomologien von 72,7% zu einer Triacylglycerol-Acylhydrolase von *Streptomyces* sp. M11 (PÉREZ et al. 1993) und von 66,7% zu der Triacylglycerol-Lipase von *Streptomyces albus* G (CRUZ et al. 1994) gefunden.

Die BTA-Hydrolase wurde daraufhin mit zwei verschiedenen Enzymen verdaut, so daß die Sequenzen der durch den Verdau entstandenen und durch HPLC getrennten Peptidstücke bestimmt und durch Überlappung sowie durch Vergleich mit den beiden bekannten Lipasen mehr als 90% der Gesamtsequenz des Enzyms ermittelt werden konnte (Kap.7.4.7). In Bild 4.56 werden die Aminosäuresequenzen der drei Enzyme gegenübergestellt.

Die Sequenz der BTA-Hydrolase stimmte zu 62% mit der Triacylglycerol-Acylhydrolase und zu 65% mit der Triacylglycerol-Lipase überein. Innerhalb der Sequenz „fehlen“ der BTA-Hydrolase an Positionen 48 / 49 zwei Aminosäuren während an den Positionen 113 / 114 und 251 / 252 zwei „zusätzliche“ Aminosäuren existieren. Diese Sequenzdifferenzen konnten von Herrn Dr. J. van den Heuvel (GBF, Braunschweig) bestätigt werden. Er übersetzte die Proteinsequenz mittels des genetischen Codes in eine degenerierte DNA-Sequenz und entwarf darauf basierend Oligonucleotide, die zur PCR-Amplifikation eines 720 bp Fragments verwendet wurden, welches für das sekretierte Enzym codiert.

Triacylglycerol-Lipase	D N P Y E R G P A P T R A S I E A P R G P Y A V S Q T S
Triacylglycerol-Acylhydrolase	A N P Y E R G P A P T N A S I E A S R G P Y A T S Q T S
BTA-Hydrolase	A N P Y E R G P N P T D A L L E A S S G P F S V S E E N
	1 0 2 0
Triacylglycerol-Lipase	V S S L V V S G F G G G T I Y Y P T S T G D G T F G A V
Triacylglycerol-Acylhydrolase	V S S L V A S G F G G G T I Y Y P T S T A D G T F G A V
BTA-Hydrolase	V S R L S A S G F G G G T I Y Y P R E . . N N T Y G A V
	3 0 4 0 5 0
Triacylglycerol-Lipase	V V T P G F T A T E S S M A W L G P R L A S Q G F V V F
Triacylglycerol-Acylhydrolase	V I S P G F T A Y Q S S I A W L G P R L A S Q G F V V F
BTA-Hydrolase	A I S P G Y T G T E A S I A W L G E R I A S H G F V V I
	6 0 7 0 8 0
Triacylglycerol-Lipase	T I D T L T T L D Q P D S R G R Q M L A A L D Y L T E R
Triacylglycerol-Acylhydrolase	T I D T N T T L D Q P D S R G R Q L L S A L D Y L T Q R
BTA-Hydrolase	T I D T I T T L D Q P D S R A E Q L N A A L N H M I N R
	9 0 1 0 0 1 1 0
Triacylglycerol-Lipase	. . S S A R T R I D G T R L G V I G H S M G G G G T L E
Triacylglycerol-Acylhydrolase	. . S S V R T R V D A T R L G V M G H S M G G G G S L E
BTA-Hydrolase	A S S T V R S R I D S S R L A V M G H S M G G G G T L R
	1 2 0 1 3 0 1 4 0
Triacylglycerol-Lipase	A A K S R P S L K A A I P L T P W N L D K T W P E V T T
Triacylglycerol-Acylhydrolase	A A K S R T S L K A A I P L T G W N T D K T W P E L R T
BTA-Hydrolase	K A S Q R P D L K A A I P L T P W H L N K N W S S V T V
	1 5 0 1 6 0
Triacylglycerol-Lipase	P T L V V G A D G D T V A P V A T H A K P F Y S S L P S
Triacylglycerol-Acylhydrolase	P T L V V G A D G D T V A P V A T H S K P F Y E S L P G
BTA-Hydrolase	P T L I I G A D L D T I A P V A T H A K P F Y N S L P S
	1 7 0 1 8 0 1 9 0
Triacylglycerol-Lipase	S T D R A Y L E L N N A T H F A P N L S N T T I A K Y S
Triacylglycerol-Acylhydrolase	S L D K A Y L E L R G A S H F T P N T S D T T I A K Y S
BTA-Hydrolase	S I S K A Y L E L D G A T H F A P N I P N K I I G K Y S
	2 0 0 2 1 0 2 2 0
Triacylglycerol-Lipase	V S W L K R F I D D D T R Y E Q F L C P L P V P D R . .
Triacylglycerol-Acylhydrolase	I S W L K R F I D S D T R Y E Q F L C P I P R P S L . .
BTA-Hydrolase	V A W L K R F V D N D T R Y T Q F L C P G P R D G L F G
	2 3 0 2 4 0 2 5 0
Triacylglycerol-Lipase	D I E E Y R G T C P L G G
Triacylglycerol-Acylhydrolase	T I A E Y R G T C P H T S
BTA-Hydrolase	E V E E Y R S T C P F
	2 6 0

Bild 4.56 Alignment der Aminosäuresequenzen der BTA-Hydrolase von *Thermomonospora fusca* DSM 43793 mit der Triacylglycerol-Lipase von *Streptomyces albus* G und der Triacylglycerol-Acylhydrolase von *Streptomyces* sp. M11. Das Multiple Alignment wurde mit dem Programm PileUp erstellt (Wisconsin Package, Version 9.1, Genetics Computer Group, Madison, WI, USA). Voneinander abweichende Aminosäuren an gleichen Positionen sind schattiert dargestellt. Die Box markiert eine hochkonservierte Aminosäuresequenz aus dem Bereich des aktiven Zentrums von Lipasen. Die Sequenzen der beiden *Streptomyces*-Stämme stammen aus der SP-TREMBL Datenbank (Release 7.0, 08/1998): Q56008 (*Streptomyces* sp. M11), Q59798 (*Streptomyces albus* G).



Tabelle 4.19 Aminosäurezusammensetzung der BTA-Hydrolase.

Aminosäure	BTA-Hydrolase
Alanin (Ala)	25
Asparagin / Aspartat (Asx)	26
Cystein (Cys)	2
Prolin (Pro)	19
Glutamin / Glutamat (Glx)	16
Arginin (Arg)	15
Phenylalanin (Phe)	9
Serin (Ser)	26
Glycin (Gly)	22
Threonin (Thr)	20
Histidin (His)	6
Isoleucin (Ile)	17
Valin (Val)	13
Tryptophan (Trp)	4
Lysin (Lys)	8
Leucin (Leu)	20
Tyrosin (Tyr)	10
Methionin (Met)	3

Das Stoffmengenverhältnis der Aminosäuren und das Molekulargewicht des Enzyms lassen sich direkt aus der Aminosäuresequenz ableiten (Tabelle 4.19). Die BTA-Hydrolase enthält 261 Aminosäuren. Für das Molekulargewicht ergab sich rechnerisch ein Wert von 28,2 kDa. Das Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese lag mit 27,44 kDa etwas unterhalb dieses genaueren Wertes. Der Anteil hydrophober Aminosäuren (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp) beträgt 42%.

#### 4.3.5.4 Vergleich der BTA-Enzymaktivität des gereinigten Enzyms mit der einer *Pseudomonas-sp.*-Lipase

In Kap.4.3.4.1 wurde für die gereinigte BTA-Hydrolase eine spezifische Lipaseaktivität von 360 U/mg in Bezug auf das Substrat Tributyrin mit Hilfe der Titrationsmethode ermittelt. Die Bestimmung der spezifischen Hydrolyseaktivität gegenüber dem BTA-Copolyester erfolgte gleichfalls mit dieser Methode.

Es wurde die Hydrolyse von je zwei BTA-Filmen mit einer Gesamtfläche von 2,54 cm<sup>2</sup> über einen Zeitraum von 15 Stunden in einem Reaktionsansatz von 50 µg Enzym pro 6 ml physiologischer Kochsalzlösung untersucht. Der Titrationsverlauf einer Doppelbestimmung wird als verbrauchtes Laugenvolumen über die Zeit in Bild 4.57 dargestellt. Zur Demonstra-

tion der Spezifität der BTA-Hydrolase für den Copolyester BTA 40/60 wurde als Vergleich die entsprechende Reaktion mit einer käuflich erworbenen *Pseudomonas*-sp.-Lipase gegenübergestellt.

Die spezifische BTA-Enzymaktivität läßt sich aus der Steigung der Titrationskurven ermitteln (Kap.7.4.4.3). Für die BTA-Hydrolase ergab sich ein Wert von 81 U/mg und für die *Pseudomonas*-sp.-Lipase ein um das zehnfache niedrigerer Wert von 6,4 U/mg. Nach 15 Stunden hatte die BTA-Hydrolase 31%, die *Pseudomonas*-sp.-Lipase 3,7% der vorhandenen Esterbindungen gespalten.

Bei einem Enzymscreening, bei dem der Gewichtsverlust von BTA-Filmen (BTA 40/60) in einem gepufferten System über einen Zeitraum von 24 h bestimmt wurde, zeigte die *Pseudomonas*-sp.-Lipase mit einem Gewichtsverlust von 2,2% im Vergleich zu anderen käuflich erworbenen Lipasen von *Aspergillus niger* (0,4%), *Candida cylindracea* (0%), *Rhizopus arrhizus* (0,1%) und *Rhizopus delemar* (0,7%) die besten Ergebnisse hinsichtlich der Hydrolyse des BTA-Copolyesters (PETERS 1995).

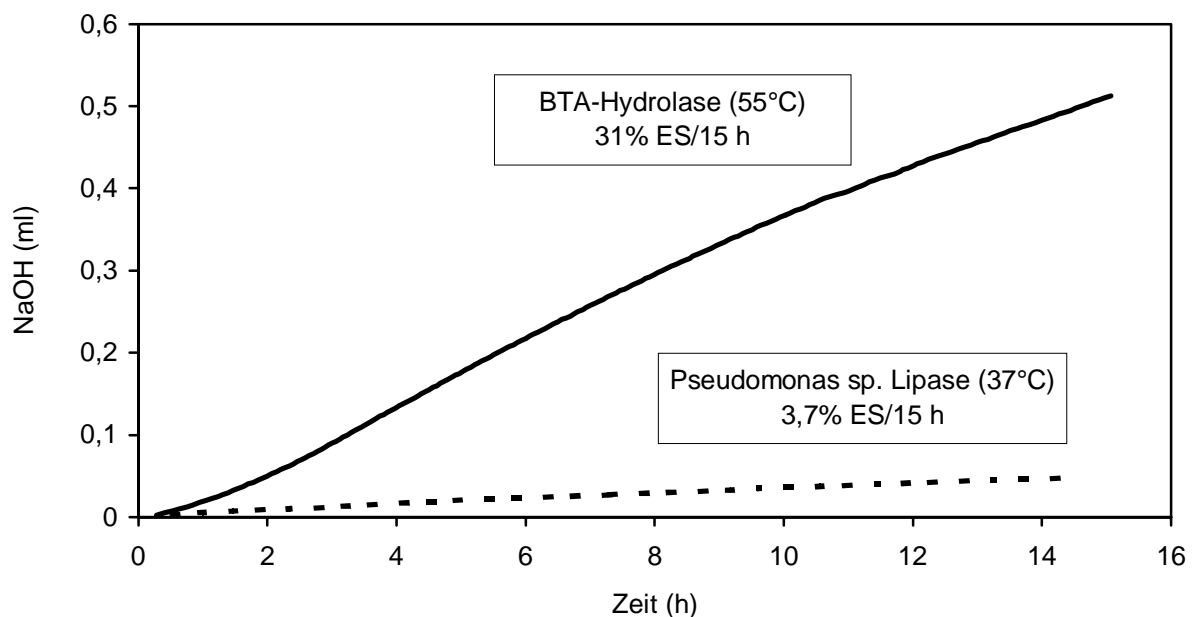


Bild 4.57 Untersuchung der Hydrolyse von BTA-Filmen durch BTA-Hydrolase und *Pseudomonas*-sp.-Lipase mittels Titration (Kap.7.4.4.3).  
Reaktionsansatz: 50 µg Enzym pro 6 ml 0.9% NaCl, pH 7,0. Gewichtsverlust der Filme durch die BTA-Hydrolase: 38%, durch die *Pseudomonas*-sp.-Lipase: 4%.

#### 4.3.5.5 Temperaturoptimum und -stabilität

Für die Hydrolyse von BTA-Filmen auf Agarplatten mit dem Gesamtorganismus *Thermomonospora fusca* K13g wurde ein Temperaturoptimum von 60°C bestimmt (Kap.4.2.2.4). Abweichend davon zeigte das gereinigte BTA-hydrolysierende Enzym optimale Aktivität bei 65°C (Bild 4.58). Bei dieser Temperatur war mit dem Mikroorganismus fast keine BTA-

Hydrolyse mehr nachweisbar. Da das Produktionsoptimum für die BTA-Hydrolase eng verbunden ist mit dem Wachstumsoptimum des Mikroorganismus (ca. 55°C, Tabelle 9.1 im Anhang), stellt dieses Ergebnis keinen Widerspruch dar. Die absolute Wachstumsgrenze für den Mikroorganismus lag bei 65°C, d.h. er war bei dieser Temperatur gar nicht mehr in der Lage, Biomasse oder Enzyme zu produzieren.

Dieses Phänomen des signifikant höheren Temperaturoptimums der extrazellulären Enzymaktivität gegenüber dem des Wachstums und der Enzymproduktion ist nach MCCARTHY et al. (1988) ein allgemeines Merkmal extrazellulärer Enzyme verschiedener Mikroorganismen. Es wird für Xylanasen von HOLTZ et al. (1991), KLUEPFEL et al. (1986) und von MCCARTHY et al. (1985), für Lipasen von LIU et al. (1972), MURAOKA et al. (1982), SUGIHARA et al. (1991) und von SCHMIDT-DANNERT et al. (1994), sowie für PHB-Depolymerasen von MÜLLER und JENDROSSEK (1993) beschrieben.

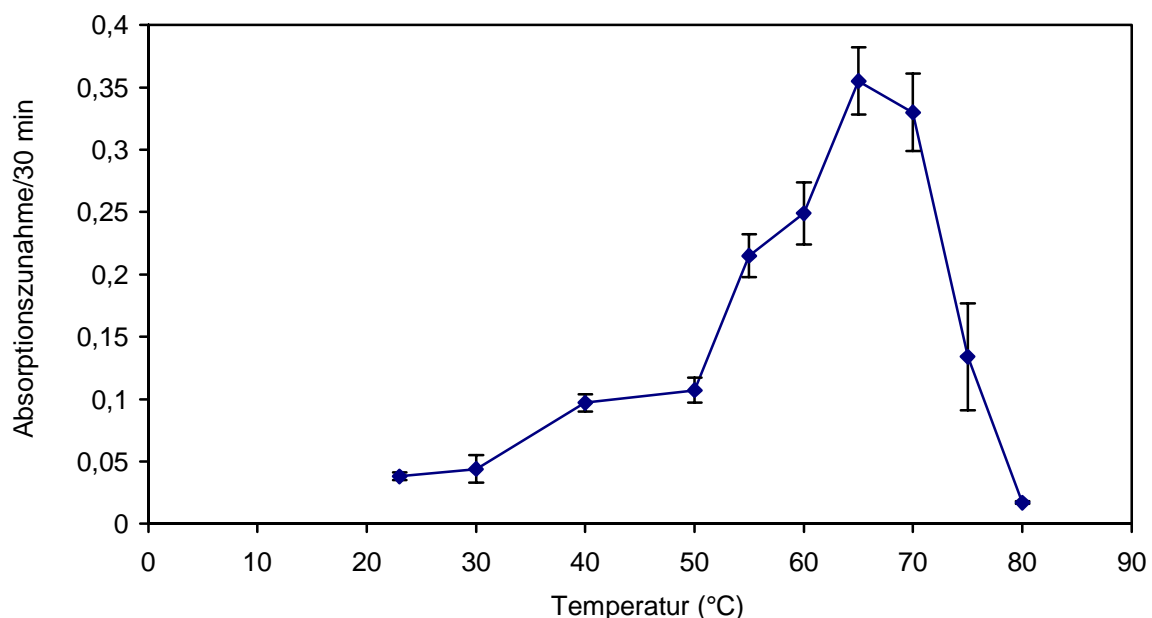


Bild 4.58 Einfluß der Temperatur auf die Aktivität des gereinigten BTA-hydrolysierenden Enzyms.  
Bestimmung der BTA-Enzymaktivität: UV-Absorptionstest (Kap.7.4.4.2).

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität wurde die Aktivität des Enzyms im Anschluß an eine halbstündige Inkubation bei verschiedenen Temperaturen im standardisierten UV-Absorptionstest (Kap.7.4.4.2) bei 55°C gemessen. Wie aus Bild 4.59 zu erkennen ist, war das Enzym unter den beschriebenen Versuchsbedingungen bis zu einer Temperatur von 65°C stabil. Erst nach einer Inkubation von 30 min bei 70°C verlor es ca. 85% seiner Aktivität durch thermische Denaturierung.

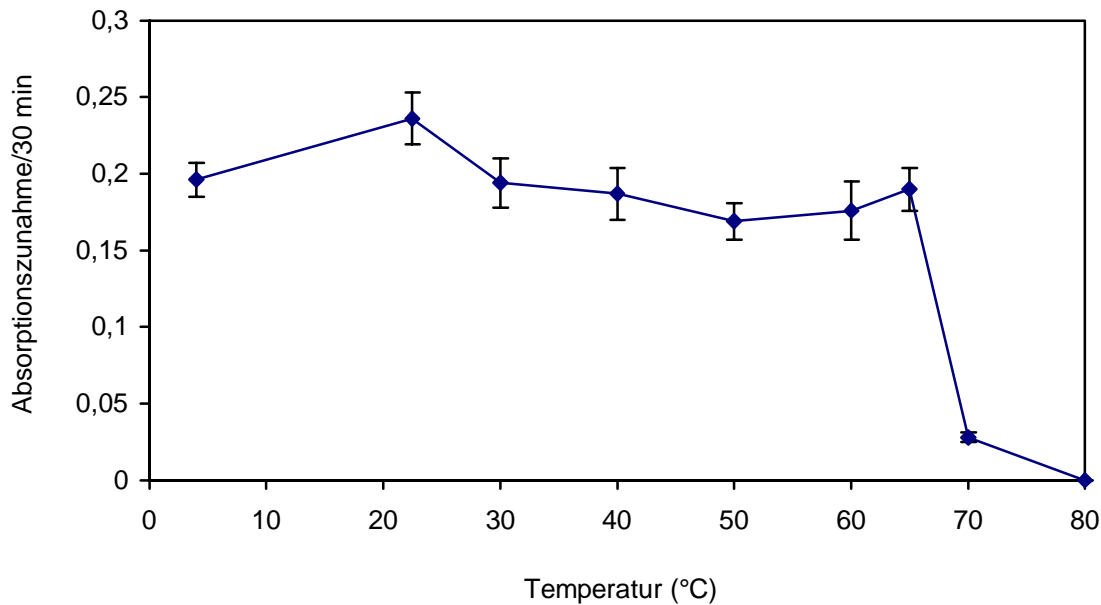


Bild 4.59 Einfluß der Temperatur auf die Stabilität des gereinigten BTA-hydrolysierenden Enzyms.  
Die Enzymlösung wurde vor Einsatz in den UV-Absorptionstest (Kap.7.4.4.2, 55°C, pH 7,1) 30 min bei den entsprechenden Testtemperaturen inkubiert.

#### 4.3.5.6 pH-Optimum des gereinigten BTA-hydrolysierenden Enzyms

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden verschiedene Puffersysteme eingesetzt, wie sie allgemein in der Literatur angegeben werden (z.B. SCHMIDT-DANNERT et al. 1994, OMAR et al. 1987). Zunächst wurde mit 0,15 M Citratpuffer im pH-Bereich von 4,0 bis 7,0 gearbeitet. Wie in Bild 4.60 zu sehen ist, lag das Optimum der Enzymaktivität mit diesem Puffer bei pH 6,0, während bei einem pH-Wert von 7,0 nur geringfügige Aktivität gemessen wurde. Dies war erstaunlich, da bei pH 7,1 das Temperaturoptimum und die Temperaturstabilität der BTA-Hydrolase ermittelt wurden und dabei höhere Enzymaktivitäten gemessen wurden (0,35 Einheiten/30 min) als in diesem Versuch (0,17 Einheiten/30 min).

Daraufhin wurde derselbe pH-Bereich mit 0,1 M Phosphatpuffer kontrolliert. Das pH-Optimum verschob sich dabei um 0,5 Einheiten auf pH 6,5. Die Aktivität bei pH 7,0 war jedoch ähnlich gering wie in den mit Citratpuffer durchgeführten Versuchen, so daß eine letzte Versuchsreihe mit 0,02 M Phosphatpuffer durchgeführt wurde. Aus dem Verlauf der Kurve dieses Versuches läßt sich ableiten, daß das Optimum zwischen pH 6,5 und 7,0 liegt, da auch bei pH-Werten von 7,0 bzw. 7,1 relativ hohe Enzymaktivität beobachtet wurde.

Diese Ergebnisse könnten auf eine Abhängigkeit der Aktivität des BTA-hydrolysierenden Enzyms von der Ionenstärke des Puffers hinweisen: Je geringer die Ionenstärke des Puffers, umso mehr verschiebt sich das pH-Optimum hin zum Neutralpunkt und umso höher ist die Aktivität des Enzyms.

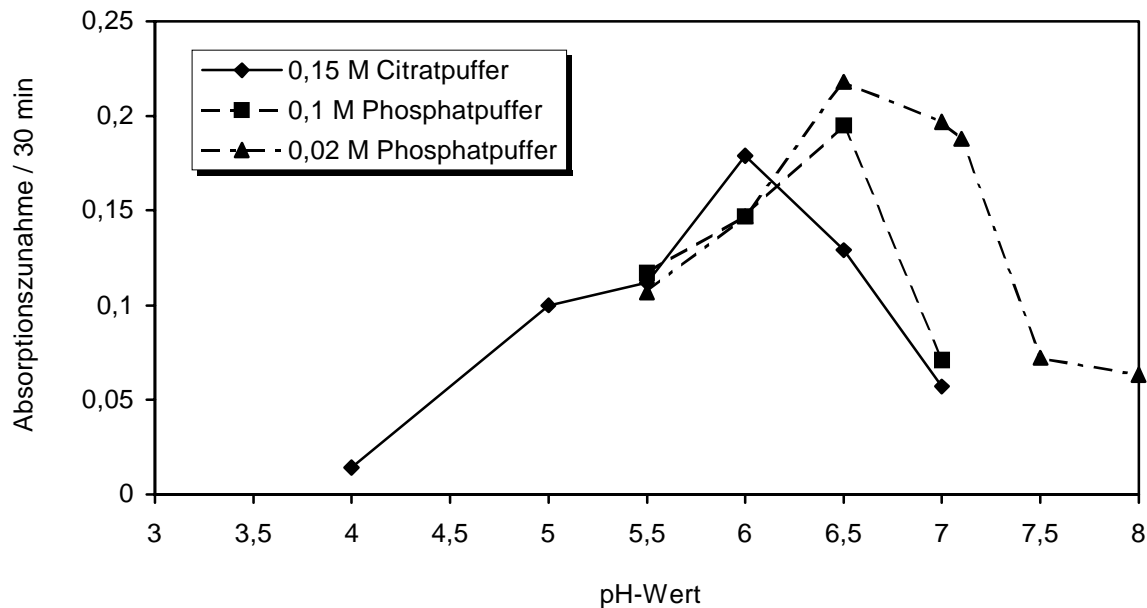


Bild 4.60 Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität des gereinigten BTA-hydrolysierenden Enzyms. Bestimmung der Enzymaktivität durch Detektion freier Terephthalsäure mit dem UV-Absorptionstest (Kap.7.4.4.2).

#### 4.3.5.7 Substratspektrum der BTA-Hydrolase bezüglich verschiedener Polyesterstrukturen

Die Spaltung verschiedener Polyesterstrukturen durch den Gesamtorganismus *Thermomonospora fusca* (Isolate K7a-3 und K13g) wurde in Kap.4.2.2.3 durch die Bestimmung des Gewichtsverlustes von Polymerfilmen auf Agarplatten untersucht. Offen blieb dabei die Frage, ob der Organismus verschiedene hydrolytische Enzyme für die einzelnen Polyesterstrukturen synthetisierte, oder ob das BTA-hydrolysierende Enzym über eine ausreichend breite Substratspezifität verfügt, um alle Strukturen zu spalten.

In Bild 4.61 gibt die Höhe der Balken Auskunft über die Aktivität des gereinigten BTA-hydrolysierenden Enzyms gegenüber den verschiedenen Polyesterstrukturen. Sie wurde mit Hilfe der Reagenzglas-Methode (Kap.7.4.4.1) bestimmt. Die Anordnung der verschiedenen Polymere von links nach rechts steht dabei für die Reihenfolge der Geschwindigkeit der Polyester-spaltung durch den gesamten Mikroorganismus (Kap.4.2.2.3, Bild 4.15).

Während der Mikroorganismus den synthetischen Copolyester BTA 40/60 am schnellsten und Bionolle neunfach langsamer hydrolysierte, zeigte das gereinigte BTA-hydrolysierende Enzym gerade gegenüber dem letzten Polymer eine auffallend hohe Hydrolyseaktivität. Auch Bayer Tir 1874 und SP 3/13 wurden von dem Enzym in verhältnismäßig stärkerem Maße hydrolysiert als dies durch den Mikroorganismus selbst geschah. Die reine BTA-Hydrolase verfügt demnach über eine ausgeprägt breite Substratspezifität.

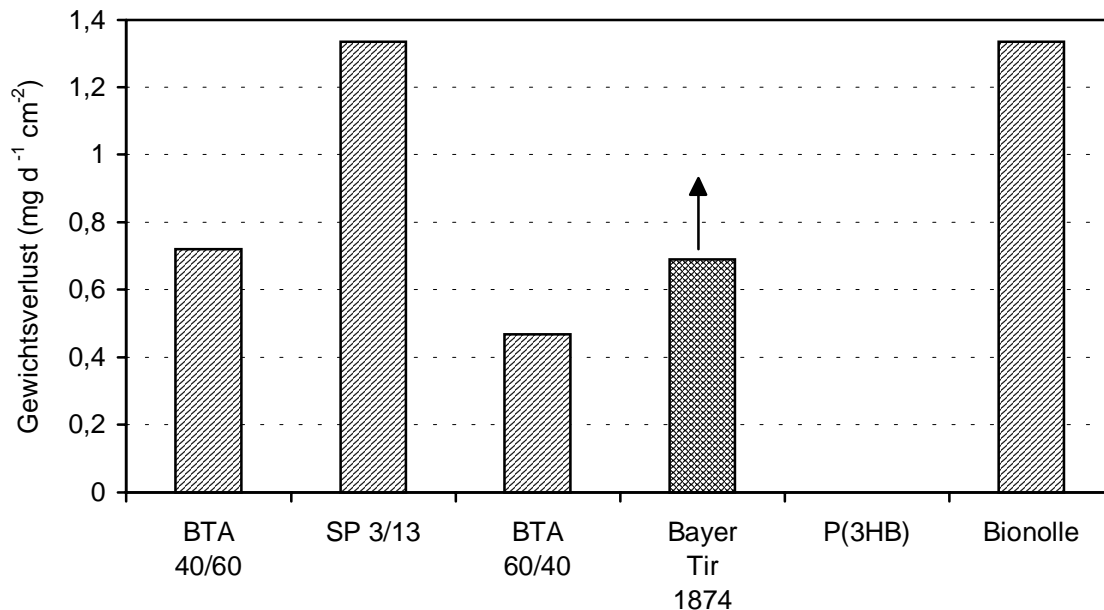


Bild 4.61 Hydrolyse von Polymerfilmen durch die gereinigte BTA-Hydrolase (Reagenzglas-Methode, Kap.7.4.4.1).  
Pfeil Die Polyesteramid-Filme waren bereits nach 17 h vollständig hydrolysiert.  
 Reaktionsansatz (n=2): Polymerfilm ( $\varnothing = 0,9$  cm), 1 ml 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1), 25  $\mu$ g Enzym, 17 h, 55°C.

Eine Spaltung des natürlich vorkommenden Polyesters P(3HB) durch Stämme von *Thermomonospora fusca* erfolgte nachweislich auf Agarplatten und in Flüssigkulturen (Kap.4.2.2.3 und Kap.4.2.3.4). Von der gereinigten BTA-Hydrolase wurde der Polyester jedoch nicht gespalten, was mit den Beobachtungen aus Kap.4.2.3.4 übereinstimmt. Dies stellt die Fähigkeit des Mikroorganismus unter Beweis, mindestens zwei unterschiedliche Hydrolasen, eine P(3HB)-Depolymerase und eine BTA-Hydrolase produzieren zu können.

#### 4.3.5.8 Substratspektrum der BTA-Hydrolase bezüglich verschiedener Triglyceride

Häufig wird in der Literatur die Substratspezifität von Lipasen durch die vergleichende Hydrolyse von Triglyceriden mit jeweils identischen Fettsäuren bestimmt. Diese Vorgehensweise ist naheliegend, da Triglyceride natürliche Substrate der Lipasen darstellen. Die enzymatische Aktivität wird jedoch von physikochemischen Effekten überlagert. Die Ester von längererkettigen, gesättigten Fettsäuren (Kettenlängen von 12 bis 16 Kohlenstoffatomen) liegen bei den Reaktionstemperaturen der Enzyme meist fest vor. Da große Unterschiede in Bezug auf die verfügbare Oberfläche bei Einsatz von festen und flüssigen Substraten auftreten, ist nach SUGIURA und ISOBE (1975) kein sinnvoller Vergleich der Aktivitäten möglich. Verwendet man Substrate mit dem gleichen Aggregatzustand oder als Emulsionen aus einer Lösung des Substrates in Puffer, können diese Schwierigkeiten umgangen werden.

Aus diesem Grunde wurden mit der BTA-Hydrolase nur Triglyceride untersucht, die bei der Versuchstemperatur als Öl vorlagen. In Bild 4.62 sind die Aktivitäten der BTA-Hydrolase gegenüber Triglyceriden mit 2 bis 10 sowie mit 18 Kohlenstoffatomen nach titrimetrischer Bestimmung (Kap.7.4.4.3) dargestellt. Gegenüber den Triglyceriden Triacetin ( $C_2$ ), Tributyrin ( $C_4$ ) und Tricaproin ( $C_6$ ) zeigte das Enzym etwa gleich hohe spezifische Aktivitäten im Bereich von 300 U/mg. Mit zunehmender Kettenlänge (Tricaprylin ( $C_8$ ), Tricaprin ( $C_{10}$ )) nahm dann die Aktivität des Enzyms ab. Gegenüber Triolein ( $C_{18}$ ) wurde nur eine geringe spezifische Enzymaktivität von 13 U/mg beobachtet.

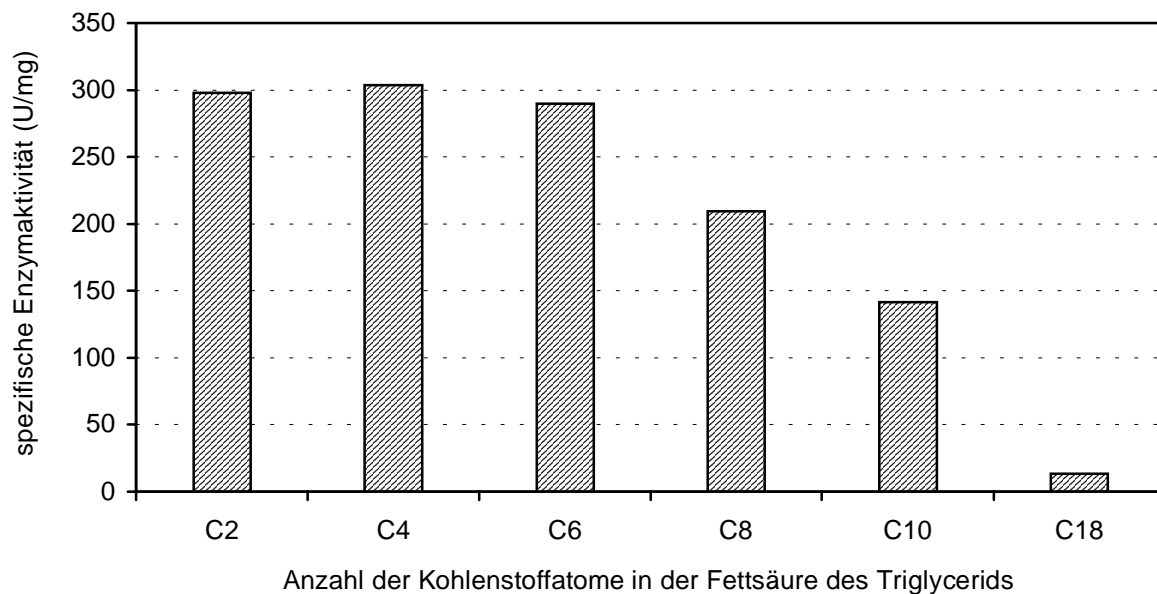


Bild 4.62 Titrimetrische Bestimmung der Hydrolyse von Triglyceriden durch die gereinigte BTA-Hydrolase.  
Reaktionsansatz: 20 µg Enzym in 6 ml Substratlösung (Kap.7.4.4.3), 55°C.

## 5 Diskussion

### 5.1 BTA-hydrolysierende Mikroorganismen

#### 5.1.1 Vorkommen und Verbreitung

Die Kompostierung gilt als ein wesentlicher Entsorgungsweg z.B. für Verpackungen aus biologisch abbaubaren Werkstoffen. Es ist somit wichtig, das Abbauverhalten des synthetischen Copolyesters BTA 40/60 im Kompost hinsichtlich der Vielfalt potentiell abbauender Arten von Mikroorganismen zu charakterisieren. Weiterhin war es das Ziel, Mikroorganismen-Stämme mit möglichst hohen Hydrolyseleistungen für grundlegende Untersuchungen zum mikrobiellen BTA-Abbau zu isolieren.

Die Ergebnisse der Isolierung BTA-hydrolysierender Mikroorganismen aus Kompost zeigten, daß speziell der Gruppe der thermophilen Actinomyceten - sowohl von der Anzahl der Organismen als auch von den erreichten Hydrolyseleistungen - eine wichtige Rolle bei der Kompostierung des BTA-Copolyesters zukommt. Für aus dem Kompost isolierte Pilze und andere Bakterien konnten keine signifikanten BTA-Hydrolyseleistungen nachgewiesen werden.

Wie ein Screening von ca. 1300 Stämmen der Actinomyceten-Stammsammlung der DSMZ ergab, war die Fähigkeit, den BTA-Copolyester zu spalten, nicht auf eine bestimmte Gruppe der Actinomyceten beschränkt - sofern man die Einteilung zugrunde legt, die in „Bergey's manual of determinative bacteriology“ (HOLT et al. 1994) veröffentlicht ist. Es wurden aber deutlich mehr BTA-hydrolysierende Stämme in der Gruppe der thermophilen als in der Gruppe der mesophilen Actinomyceten gefunden (19,5% der getesteten thermophilen zu 1,6% der mesophilen Stämme). Die Fähigkeit zur BTA-Hydrolyse war tendenziell jeweils allen Stämmen einer Art gemeinsam, womit die Wahrscheinlichkeit hoch ist, das codierende Gen auf dem Bakterienchromosom und nicht auf Plasmiden zu finden.

Actinomyceten sind eine Gruppe weitverbreitet vorkommender Bodenmikroorganismen, die zum Nährstoffrecycling durch primär saprophytisches Wachstum auf abgestorbenem organischen Material beitragen (MCCARTHY et al. 1992). Sie sind in der Lage, ein weites Spektrum von Energie- und Kohlenstoffquellen zu nutzen und diese metabolische Diversität sorgt, gemeinsam mit der Fähigkeit zu sporulieren, für ihre weite Verbreitung (MCCARTHY und WILLIAMS 1992). Das myzelartige Wachstum dieser Organismen ist eine Adaptation an die Kolonisation unlöslicher polymerer Substrate, vorwiegend pflanzlicher Materialien, im Boden. Um diese Substrate nutzen zu können, müssen die Actinomyceten eine Reihe



extrazellulärer Enzyme sekretieren (McCARTHY et al. 1992, McCARTHY und WILLIAMS 1992). Das auf den Pflanzenfasern direkt aufwachsende Myzel sichert zum einen den größtmöglichen Effekt der sekretierten Enzyme sowie zum anderen die Aufnahme der durch die Enzyme gewonnenen löslichen Spaltprodukte (BONNER und STUTZENBERGER 1988). Dementsprechend spielen obligat thermophile Actinomyceten eine wichtige Rolle in der Zersetzung pflanzlicher Materialien in Kompostierungsanlagen (BIDLINGMAIER 1985, LACEY 1973). Insbesondere Arten der Gattung *Thermomonospora* sind fähig eine ganze Reihe extrazellulärer Enzyme zu sekretieren, wodurch sie eine dominierende Population in der Heißrottephase der Kompostierung bilden (FERGUS 1964, Bernier et al. 1988).

Zu dieser Gattung gehören die beiden Isolate K7a-3 und K13g, die die besten Hydrolyseleistungen bezüglich des BTA-Copolyesters zeigten (Hydrolyse von BTA-Filmen zu mehr als 80% innerhalb einer Woche auf MSV-Medium). Aufgrund von chemotaxonomischen Zellanalysen sowie der Analyse ihrer 16S rDNA-Partialsequenz wurden die Isolate als Stämme der Art *Thermomonospora fusca* identifiziert. Stämme dieser Art sind fähig, über einen großen Temperatur- (35 - 60°C) und pH-Bereich (pH 6 - 12) zu wachsen und stellen in dieser Hinsicht nach Ergebnissen von McCARTHY und CROSS (1984) die robustesten Vertreter der Gattung *Thermomonospora* dar.

## 5.1.2 Esterbindungen in natürlichen Substraten der Actinomyceten

### 5.1.2.1 Vorbemerkung

Der BTA-Copolyester ist ein rein synthetisches, nicht in der Natur vorkommendes Polymer. Viele synthetische Verbindungen widersetzen sich einem Eintritt in den natürlichen Kohlenstoffkreislauf. Dies wird im allgemeinen mit der Tatsache begründet, daß anthropogene Substanzen relativ neu sind und Mikroorganismen keine Zeit hatten, für diese Substanzen - im Gegensatz zu natürlich vorkommenden Substanzen - abbauende Enzyme zu entwickeln. Beispiele für mikrobielle Aktivitäten gegenüber von Menschenhand geschaffenen organischen Substanzen sind meistens das Ergebnis breiter Enzymspezifitäten (AMINABHAVI et al. 1990). Bioabbaubare, synthetische Polymere verfügen meist über Strukturen, die denen natürlich vorkommender Polymere ähneln (Kap.3.2.3). Es liegt nahe, daß Mikroorganismen Enzyme produzieren, die nicht zwischen den zwar ähnlichen aber nicht identischen Strukturen der natürlichen Substrate und der biologisch abbaubaren Kunststoffe unterscheiden können (KAWAI 1995). Diese Hypothese wurde kürzlich von MURPHY et al. (1996) am Beispiel eines polycaprolactonspaltenden Enzyms gefestigt. Die Autoren konnten mit ihren Experimenten eindeutig belegen, daß es sich bei einer PCL-Depolymerase um eine Cutinase handelt und daß PCL-Oligomere, die strukturelle Ähnlichkeiten zu natürlichen Induk-

toren der Cutinase aufwiesen, die Produktion der PCL-Depolymerase bzw. Cutinase induzierten.

Demnach ist anzunehmen, daß die Struktur des BTA-Copolyesters einem natürlichen Substrat der Actinomyceten ähnelt und von dem BTA-hydrolysierenden Enzym aufgrund einer breiten Substratspezifität lediglich zufällig als Substrat erkannt wird. Sucht man nach Esterbindungen in Makromolekülen der Natur, so findet man diese vor allem in pflanzlichen Bestandteilen wie Lignocellulosen, Cutin und Suberin sowie im bakteriellen Speicherstoff Polyhydroxybuttersäure.

### 5.1.2.2 Lignocellulosen

Lignocellulosen sind heterogene, wenig definierte Strukturen aus Lignin, Hemicellulosen und Cellulose (Tabelle 5.1), die in vielen Pflanzenarten gefunden werden. Sie übernehmen Stützfunktionen und stellen eine hohe Barriere des Pflanzengewebes gegenüber dem mikrobiellen Angriff dar (JEFFRIES 1994, TRIGO und BALL 1994). Es gilt als sicher, daß die einzelnen Komponenten über kovalente Lignin-Kohlenhydrat-Bindungen miteinander verknüpft sind (BELLAMY 1974, KIRK und FARRELL 1987, JEFFRIES 1994, TRIGO und BALL 1994). Viele verschiedene Typen derartiger Bindungen wurden vorgeschlagen, doch die größten Beweise existieren für Ether- und Esterbindungen. Die Bindungen entstehen durch Reaktion der Benzylgruppen im Lignin mit den freien Carboxylgruppen der Uronsäuren in Hemicellulosen (Esterbindungen) bzw. den Hydroxylgruppen der Polysaccharide (Etherbindungen). Auch die Beteiligung von Pectinen an der Bindung zwischen Lignin und Hemicellulosen wird vermutet. Als Poly-Galactopyranuronsäuren sind Pectine fähig, Ester- und Etherbindungen mit Lignin zu bilden (JEFFRIES 1994). Weitere Esterbindungen kommen zwischen monophenolischen Komponenten (z.B. p-Coumarsäure und Ferulasäure) und Arabinoxylanen sowie in den Acetyl-Seitengruppen der Hemicellulosen vor (TRIGO und BALL 1994). So sind ca. 60-70% der Xylopyranosyl-Reste von Hartholz-Xylan durch Esterbindungen in Position 2 oder 3 acetyliert (Bild 5.1).

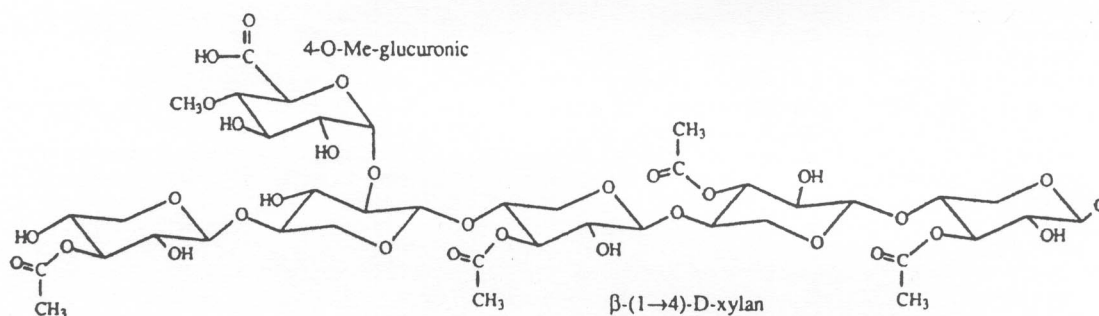


Bild 5.1 O-Acetyl-4-O-methyl-D-glucuronoxylan von Angiospermen (zitiert bei JEFFRIES (1994))

In natürlichen terrestrischen Habitaten (Böden und Kompost) wird Lignin durch eine komplexe Microflora - bestehend aus eukaryontischen und prokaryontischen Organismen - abgebaut. Bakterielle Lignin-Abbauraten sind jedoch verglichen mit denen von Weißfäulepilzen, z.B. *Phanerochaete chrysosporium*, sehr gering. Diese unterschiedlichen Abbauraten sind sicherlich verschiedenartigen Strategien des Ligninabbaus zuzuschreiben, die von beiden Mikroorganismengruppen entwickelt wurden (TRIGO and BALL 1994). Der bakterielle Abbau resultiert eher in der Verflüssigung als in der Depolymerisation von Lignocellulosen. Enzymatische Aktivitäten gegenüber Lignocellulosen wurden dabei in vielen Actinomyceten beobachtet (MCCARTHY 1987).

Tabelle 5.1 Beschreibung der Lignocellulose-Komponenten Cellulose, Hemicellulose und Lignin sowie des Pectins.

Naturstoff	Struktur, Vorkommen, abbauende Mikroorganismen und Enzyme
Cellulose (SCHLEGEL 1992, S. 402-407)	Homopolymer aus $\beta$ -D-Glucose, verknüpft über $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen  Grundbestandteil pflanzlicher Substanz (Zellwände)  Abbau durch viele Pilze, Myxobakterien und „Eubakterien“ Cellulase-System: Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase, Exo- $\beta$ -1,4-Glucanase, $\beta$ -Glucosidase
Hemicellulose (BIELY et al. 1986, JOHNSON et al. 1987)	Heteropolymere entweder aus Pentosen (Xylose, Arabinose) oder Hexosen (Glucose, Mannose, Galaktose) sowie aus Uronsäuren z.B. Xylan: 1,4-glykosidisch verknüpfte $\beta$ -D-Xylosen  in Pflanzen als Reserve- oder Stützsubstanzen  Xylan wird rascher und von einer größeren Anzahl Mikroorganismen abgebaut, als Cellulose Xylanase, $\beta$ -Xylosidase, Acetylxytan-Esterase
Lignin (KIRK und FARRELL 1987)	heterogenes, optisch aktives, quervernetztes Polymer aus Phenylpropan-Abkömmlingen (Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol), die im Zuge freier radikalischer Copolymerisation vorwiegend über Ether und C-C-Bindungen miteinander verknüpft wurden.  In höheren Pflanzen hauptsächlich in den Zellwänden vorkommendes Polymer, das mechanische Funktionen erfüllt  Abbau hauptsächlich durch Weißfäulepilze; es besteht kein Zweifel, daß auch Bakterien (u.a. Actinomyceten) beteiligt sind, doch erfolgt der Abbau durch diese extrem langsam. Ligninase-System: Mn-abhängige Peroxidasen, Phenoloxidasen, Laccasen
Pectin (NUHN 1990)	kompliziert gebaute Polysaccharide; Grundbaustein ist eine $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpfte D-Galactopyranuronsäure. In diese Kette können neutrale Zucker wie L-Rhamnose eingebaut sein. An das Galacturonan sind Galactane, Arabinane, Galactoxylane oder Xylofucane gebunden. Die Galacturonsäurereste können mit Methanol verestert sein.  Bestandteile der primären Zellwand und der Interzellulärschicht von Pflanzen  Abbau durch viele Pilze und Bakterien Pectinesterasen, Depolymerasen

Auch Stämme der Art *Thermomonospora fusca* sind an der Freisetzung löslicher Substanzen aus lignocellulosehaltigen Materialien beteiligt. Weiterführende Metabolisierungen wurden jedoch hauptsächlich für die Kohlenhydratanteile und weniger für den Ligninanteil derartiger Verbindungen beobachtet (CRAWFORD 1974, CRAWFORD und SUTHERLAND 1980, BALL et al. 1989, 1990). So wurde für diesen Mikroorganismus die Sekretion depolymerisierender Enzyme wie Xylanasen (McCARTHY et al. 1985, BALL und McCARTHY 1989, HOLTZ et al. 1991), Cellulasen (CALZA et al. 1985), Peroxidasen (ROB et al. 1995), Pectinasen (STUTZENBERGER 1987) und Proteasen (DESAI und DHALA 1969, GUSEK und KINSELLA 1987) beschrieben.

### 5.1.2.3 Cutin und Suberin

Oberirdische Bereiche von Pflanzen wie Blätter, Blüten, Früchte und junge Stiele sind durch die Cuticula gegen Austrocknung und den Befall durch pathogene Mikroorganismen geschützt. Die Cuticula ist mit den epidermalen Pflanzenzellwänden durch eine Pectinschicht verbunden (Bild 5.2a). Die strukturelle Komponente der Cuticula, das Cutin, ist ein unlöslicher aliphatischer Biopolyester aus Hydroxy- und Epoxy-Fettsäuren (Bild 5.3a).

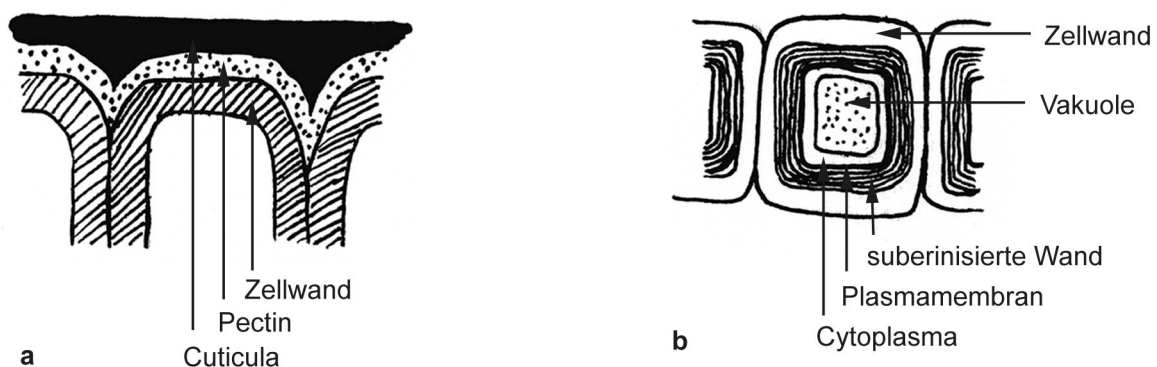


Bild 5.2 Schematische Darstellung oberirdischer und unterirdischer Bereiche von Pflanzen (nach KOLATTUKUDY 1985).  
 a die Cuticula, b suberinisierte Zellwände.

Es ist eingebettet in eine komplexe Mischung relativ unpolarer Lipide, die allgemein „Wachse“ genannt werden. Geringe Mengen aromatischer Komponenten wie Phenolsäuren (z.B. p-Coumarsäure) können mit dieser aliphatischen Matrix über Esterbindungen verbunden sein (KOLATTUKUDY 1980, 1985).

Suberin, ein anderes pflanzliches Polymer, ist wie das Cutin extrazellulär, jedoch in den unterirdischen Teilen der Pflanzen sowie innerhalb der Zellwände zu finden (Bild 5.2b und Bild 5.3b). Die chemische Natur dieses unlöslichen Polymers ist weniger gut bekannt als die des Cutins. In seine phenolische Matrix, die derjenigen des Lignins ähnelt, sind Bereiche

aus aliphatischen Polyestern eingelagert, die wiederum dem Cutin ähneln (KOLATTUKUDY 1980, 1985).

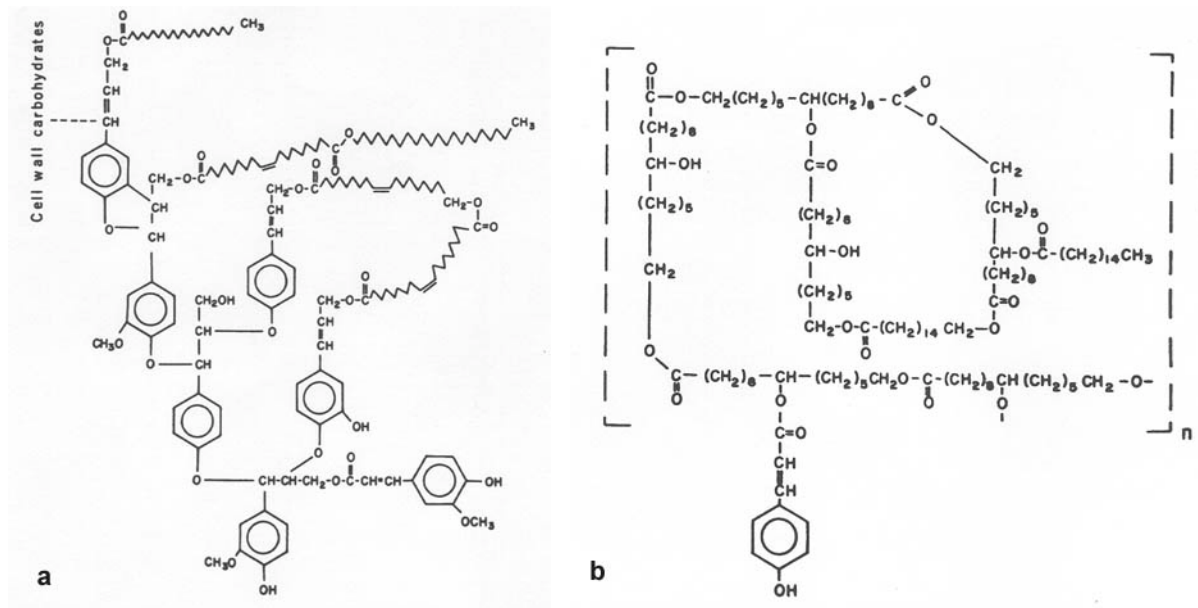


Bild 5.3 Strukturmodelle für die Polymere a Cutin und b Suberin (nach KOLATTUKUDY 1980).

In Kulturen diverser phytopathogener Pilze konnte die Aktivität cutinhydrolysierender, extrazellulärer Enzyme nachgewiesen und sogenannte Cutinasen z.B. aus *Fusarium solani f. pisi*, *Colletotrichum capsici* und *Venturia inaequalis* isoliert werden (BAKER und BATEMAN 1978, PURDY und KOLLATTUKUDY 1973, 1975, ETINGER et al. 1987, KÖLLER und PARKER 1989). Im Gegensatz zu den pilzlichen Cutinasen ist nur sehr wenig über bakterielle Cutinasen bekannt. SEBASTIAN und KOLLATTUKUDY (1988) isolierten eine bakterielle Cutinase aus der Kultur eines *Pseudomonas-putida*-Stammes, und FETT et al. (1994) wiesen Cutinaseaktivität in den Kulturen dreier *Pseudomonas-aeruginosa*-Stämme nach. Den Nachweis für die Produktion von Cutinasen durch *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces badius* und weiterer *Streptomyces*-Arten erbrachten LIN und KOLATTUKUDY (1980) und FETT et al. (1992, 1994).

Für Stämme der Art *Thermomonospora fusca* wurde ein Nachweis von Cutinaseaktivität bislang nicht in der Literatur beschrieben.

#### 5.1.2.4 Polyhydroxybuttersäure (P(3HB))

Der natürlich vorkommende aliphatische Polyester Polyhydroxybuttersäure (P(3HB)), ein bakterieller Speicherstoff, wird von sehr vielen Mikroorganismen gespalten, darunter Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Actinomyceten und Pilze (BRANDL et al. 1995, JENDROSSEK et al. 1996). Das P(3HB)-Abbauvermögen von *Thermomonospora fusca* wurde bereits von KEMPF und KUTZNER (1988) erwähnt und auch bei den in dieser Arbeit beschrie-

benen Isolaten K7a-3 und K13g beobachtet. Mit verschiedenen Experimenten ließ sich nachweisen, daß das P(3HB)-hydrolysierende Enzym nicht identisch mit dem BTA-hydrolysierenden Enzym ist (Kap.4.2.3.4 und Kap.4.3.5.7).

Zusätzlich zum natürlich vorkommenden Polyester P(3HB) und den synthetischen aliphatisch-aromatischen Copolyestern mit unterschiedlichen Anteilen der aromatischen Komponente (BTA 40/60 und BTA 60/40) wurde die Spaltung weiterer Polyesterstrukturen durch *Thermomonospora fusca* K7a-3 und K13g getestet. Beide Isolate waren in der Lage, aliphatische Polyester unterschiedlicher Kettenlänge der Diole und Dicarbonsäuren (SP 3/13 und Bionolle, das einem SP 4/4 entspricht) und ein Polyesteramid (Bayer Tir 1874) zu spalten. Sie zeigten identische Muster hinsichtlich der Hydrolyseleistung gegenüber den jeweiligen Strukturen (Kap.4.2.2.3).

Diese Ergebnisse sowie die in der Literatur beschriebenen Fähigkeiten zum Abbau natürlicher Polymere kennzeichnen die thermophilen Actinomyceten als eine für den Abbau von Kunststoffen interessante Organismengruppe, die jedoch in dieser Hinsicht bislang noch nicht eingehend untersucht wurde (POMMER 1995). Über den durch Actinomyceten bedingten Abbau von Polyhydroxybuttersäure (MERGAERT et al. 1993, 1994, 1995) und den synthetischen Polyestern Bionolle (PRANAMUDA et al. 1995) und Polycaprolacton (FIELDS und RODRIGUEZ 1976) sowie von natürlichem und synthetischem Kautschuk (TSUCHII et al. 1985, HEISEY und PAPADATOS 1995, LINOS und STEINBÜCHEL 1996, JENDROSSEK et al. 1997) wurde erst in relativ junger Vergangenheit berichtet. PRANAMUDA et al. (1995) berichteten über den Actinomyceten-Stamm HAT-6, der Abbaueigenschaften gegenüber Polyhydroxybuttersäure, Polycaprolacton und Bionolle zeigte, und auch MERGAERT und SWINGS (1996) wiesen auf die extreme Vielseitigkeit von Streptomyceten bezüglich des Polymerabbaus hin: von 171 verschiedenen Streptomyceten-Stämmen waren 139 in der Lage, Polyhydroxybuttersäure, Bionolle und Polycaprolacton zu spalten.

## **5.2 Untersuchungen zur Regulation der Synthese des polyester-spaltenden Enzyms**

Die *Thermomonospora-fusca*-Stämme K7a-3 und K13g waren in der Lage, sowohl den aliphatisch-aromatischen Copolyester BTA als auch den mikrobiellen Polyester Polyhydroxybuttersäure zu spalten. Es wurde die Existenz zweier verschiedener hydrolytischer Enzyme nachgewiesen, deren Produktion in Anwesenheit des jeweiligen Makromoleküls erfolgte. Die Induktion hydrolytischer Enzyme durch unlösliche Polymere wirft die Frage auf, wie ein solches Polymer, das aufgrund seiner Größe nicht von den Zellen aufgenommen werden kann, die Enzymsynthese zu induzieren vermag. LIN und KOLATTUKUDY (1978) vertreten die

Hypothese, daß Mikroorganismen geringe Mengen verschiedener hydrolytischer Enzyme sekretieren. Die durch die Enzyme vom Polymer abgespaltenen Hydrolyseprodukte gelangen in die Zelle, wo sie die Synthese erforderlicher Mengen der entsprechenden Hydrolase induzieren (Bild 5.4). Die Autoren stützten ihre Hypothese mit Untersuchungen des phytopathogenen Pilzes *Fusarium solani f. pisi*. Die Induktion von Cutinase durch diesen Pilz erfolgte nicht nur in Anwesenheit von Cutin im Medium, sondern auch durch geringe Mengen von Cutinhydrolysaten oder Monomeren, insbesondere durch einen aliphatischen Alkohol aus 16 C-Atomen. Einzelne Monomerfraktionen waren dabei weniger effektiv bezüglich der Cutinaseinduktion als das Gesamthydrolysat. Eine gerade noch meßbare Cutinaseaktivität wurde auch in dem Medium beobachtet, das kein Cutinhydrolysat enthielt. Die Autoren schlossen daraus, daß im Falle der Kultivierung des Pilzes mit dem Polymer sehr kleine Mengen der Cutinase zur Abspaltung von Monomeren führten, die wiederum das Cutinase-Gen einschalteten, so daß die Produktion des benötigten Enzyms in Gang gesetzt wurde. Die Repression der Cutinasebildung durch Glucose konnte bewiesen werden. Dieser Mechanismus könnte den Autoren zufolge allgemeingültig sein.

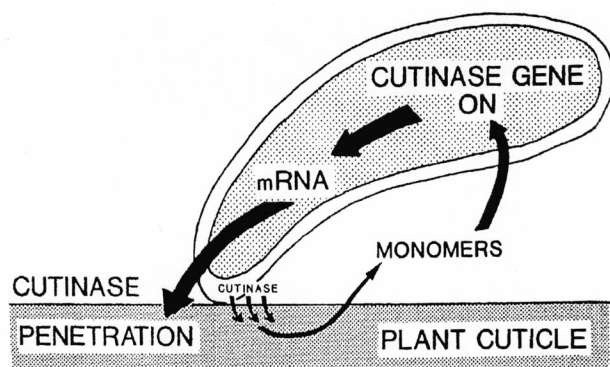


Bild 5.4

Schematische Darstellung der Induktion von Cutinase in pilzlichen Sporen (nach KOLATTUKUDY 1985).

Im Fall der Hydrolyse von P(3HB)-Filmen durch *Thermomonospora fusca* DSM 43793 konnte in den Überständen von ohne Polymer gewachsenen Kontrollkulturen in geringem Maße P(3HB)-hydrolysierende Aktivität nachgewiesen werden (Kap.4.2.3.4). Gleiches gelang zwar nicht für die Hydrolyse des BTA-Copolyesters, dennoch ist eine Produktion BTA-hydrolysierender Enzyme nicht vollkommen auszuschließen. Die Konzentrationen könnten so gering gewesen sein, daß sie mit der verwendeten Nachweismethode nicht meßbar waren.

In den Kulturüberständen von mit 1,4-Butandiol, Terephthalat oder Adipat über 24 h gewachsenen Kulturen wurde keine BTA-hydrolysierende Enzymaktivität beobachtet (Kap.5.2.3.4). Die einzelnen Monomere des BTA-Copolyesters stellen dementsprechend keine Induktoren für BTA-hydrolysierende Enzyme dar. Möglicherweise bedarf es kurzer

oligomerer Strukturen des Copolyesters, die die Zellwand passieren können und innerhalb der Zelle als Induktoren an der Regulation der Enzymsynthese beteiligt sind.

Nachdem eine deutliche Steigerung der BTA-Hydrolyse durch die Zugabe geringer Pepton- oder Pectinmengen zum Mineralsalzmedium MSV festgestellt wurde (Kap.4.2.3.2), lag die Vermutung nahe, daß dieser Effekt entweder durch einen Co-Metabolismus oder durch die Verstärkung der Induktion aufgrund der Anwesenheit eines natürlichen Induktors der BTA-Hydrolase bewirkt wurde. Im Falle des Peptons wurde beobachtet, daß die Kulturüberstände von ohne BTA-Copolyester gewachsenen Kulturen keine hydrolysierende Aktivität enthielten. Pepton stellte demnach keinen Induktor für das verantwortliche Enzymsystem dar, sondern bot dem Organismus wahrscheinlich eine günstigere Stickstoffversorgung. Ähnliche Steigerungen der Enzymproduktion durch Peptonzugabe werden von vielen Autoren für die Herstellung von Lipasen beschrieben (TOKIWA und SUZUKI 1977, SZTAJER und MALISZEWSKA 1989, OKEKE und OKOLO 1990, PETROVIĆ et al. 1990). Durchgehend weisen die Autoren im Zusammenhang mit der Austestung verschiedener Stickstoffquellen auf dieses Phänomen hin.

Wie weiter oben beschrieben, ist Pectin z.B. über Esterbindungen an Lignin oder Hemicellulosen gebunden. Da dieses Biopolymer nur ein Polysaccharid ist und nicht zur Stickstoffversorgung beiträgt, könnte das Pectin ein natürlicher Induktor der BTA-Hydrolase sein. Weiterführende Untersuchungen wurden jedoch nicht durchgeführt.

Andere organische Substrate wie z.B. einfacher Zucker (Glucose, Mannose) sowie der Biopolymere Xanthan, Xylan und Stärke zu dem Mineralsalzmedium hatten einen eher hemmenden Einfluß auf die BTA-Hydrolyse (Kap.4.2.3.2).

### 5.3 Untersuchungen zur Metabolisierung des BTA-Copolyesters

Mit Hilfe verschiedener respirometrischer Tests wurden Untersuchungen zur Metabolisierung von Spaltprodukten des BTA-Copolyesters durchgeführt, in denen einer Reinkultur von *Thermomonospora fusca* DSM 43793 sowohl der BTA-Copolyester als auch die einzelnen monomeren Bestandteile 1,4-Butandiol, Adipat und Terephthalat angeboten wurden.

Die Ergebnisse zeigen, daß *Thermomonospora fusca* DSM 43793 die bei der primären enzymatischen Spaltung des BTA-Copolyesters gebildeten Produkte nur in geringem Maße als Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen vermag. Unter Berücksichtigung des Mikroorganismen-Blindwertes wurden von dem Organismus ca. 10% des BTA-Kohlenstoffes und bei den Monomeren nur ca. 3% des Adipats im Testzeitraum von 20 Tagen veratmet. Während die Veratmung des BTA-Kohlenstoffes direkt mit dem ersten Versuchstag einsetzte, begann die des Adipats erst nachdem der Organismus die nutzbaren Bestandteile des Peptons im Medium verbraucht hatte. Zusammen mit den Ergebnissen der Induktionsversu-



che aus Kap.4.2.3.4, in denen festgestellt wurde, daß das Adipat keinen Induktor für BTA-hydrolysierende Enzyme darstellt, weisen diese Ergebnisse auf unterschiedliche Regulationsmechanismen der Synthese BTA- bzw. adipatspaltender Enzyme hin.

Um die grundsätzliche Abbaubarkeit des BTA-Copolyesters auch im Hinblick auf die Umweltsicherheit nachzuweisen, wurde das unter natürlichen Bedingungen wahrscheinliche „Ineinandergreifen“ von Stoffwechselprozessen unterschiedlicher Organismen simuliert, indem einer Mischpopulation aus Kompost die Copolyestermomere angeboten wurden. Innerhalb der Versuchszeit von 22 Tagen konnte gezeigt werden, daß alle Monomere in den eingesetzten Konzentrationen prinzipiell abgebaut werden und keine toxischen Wirkungen vorliegen, die einen Abbau verhindern. Unter Zugrundelegung der Grenzwerte aus den OECD-Richtlinien (OECD 1992) wären Adipat und auch das aromatische Terephthalat bei einem Abbau von mehr als 60% in 24 Tagen als „leicht abbaubar“ (ready biodegradable) einzustufen.

Betrachtet man die Literatur, so verwundert es nicht, daß Stämme der Art *Thermomonospora fusca* den BTA-Copolyester nicht vollständig zu metabolisieren vermögen. Nach KOBAYASHI und RITTMANN (1982) sind Actinomyceten zwar in der Lage, eine ganze Reihe komplexer organischer Komponenten anzugreifen, doch führen ihre Abbauaktionen im allgemeinen zu Metaboliten, die nur in Anwesenheit anderer Organismen mineralisiert werden können. Den Autoren zufolge sind Mischkultursysteme bei Nutzung von Actinomyceten unbedingt notwendig. Auch MCCARTHY (1987), ZIMMERMANN (1990) und KAWAI et al. (1995) weisen auf die Wichtigkeit kooperierender Aktionen zwischen Pilzen, Actinomyceten und anderen Bakterien beim natürlichen Abbau von Lignocellulosen hin.

## 5.4 Isolierung und Charakterisierung der BTA-Hydrolase

Nachdem mit dem Clear Zone Test ein zuverlässiger, in der Durchführung einfacher und schneller Enzymnachweis möglich war, erfolgte die Reinigung der BTA-Hydrolase - nach Kultivierung des Stammes *Thermomonospora fusca* DSM 43793 unter optimierten Bedingungen - aus dem Kulturüberstand durch Ammoniumsulfat-Fällung, Ionenaustauschchromatographie und hydrophober Interaktionschromatographie. Obwohl es sich im Anschluß an die Ammoniumsulfat-Fällung aufgrund der salzbeladenen Lösung angeboten hätte, direkt eine hydrophobe Interaktionschromatographie anzuschließen, wurde die Ionenaustauschchromatographie als zweiter Reinigungsschritt vorgezogen. Vorversuche hatten gezeigt, daß mit Hilfe der UNO-S1-Säule hohe Flußraten eingestellt und damit große Volumina relativ schnell konzentriert werden konnten. Gerade auf Kriterien wie Volumenreduzierung und Entfernung grober Verunreinigungen wird zu Beginn eines Reinigungsprozesses

Wert gelegt. Nach diesem Trennschritt waren meistens nur noch 4 - 6 Proteinbanden im Bereich zwischen 20 und 30 kDa und einige Banden mit Molekulargewichten kleiner als 14 kDa vorhanden. Zum Ende einer Enzymreinigung steht die Selektivität der Trennmethode im Vordergrund. Hier erwies sich die hydrophobe Interaktionschromatographie an der Phenylsepharose CL-4B als hoch selektiv, da diese Methode zu einer sehr starken Anreicherung einer einzelnen Bande führte, während andere Proteine nur noch in geringen Spuren auftraten.

Ein hoher, durch die Ammoniumsulfat-Fällung verursachter Aktivitätsverlust deutet darauf hin, daß das Verfahren nicht optimiert ist. Auszutesten wäre, ob durch die Ultrafiltration oder andere Verfahren zur Konzentrierung wie Lyophilisation, Lösungsmittel-Fällung oder durch direkte Anwendung der Ionenaustauschchromatographie eine schonendere Konzentrierung möglich wäre. Ziel der Enzymreinigung war es jedoch vorrangig, in Bezug auf Menge und Reinheit genügend Material für eine Charakterisierung des BTA-hydrolysierenden Enzyms zu erhalten. Mit dem oben beschriebenen Verfahren wurde ein Enzympräparat erhalten, das über eine hohe BTA-hydrolysierende Aktivität und eine ausreichende Reinheit verfügte, so daß neben klassischen Charakterisierungsmerkmalen auch die Aminosäuresequenz des Enzyms bestimmt werden konnte.

Die SDS-Gelelektrophorese ergab für die gereinigte BTA-Hydrolase ein Molekulargewicht von 27,44 kDa; aus der Aminosäuresequenzanalyse wurde ein Wert von 28,2 kDa berechnet. Der isoelektrische Punkt des Enzyms lag mit 6,43 im leicht sauren Bereich. Die BTA-Hydrolase zeigte optimale Aktivität bei einer Temperatur von 65°C (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1), bei der sie über einen Zeitraum von 30 Minuten 100% ihrer Aktivität behielt. Eine entsprechende Inkubation bei 70°C führte zu einem Aktivitätsverlust von ca. 85%. Hinsichtlich des pH-Wertes zeigte das Enzym optimale Aktivität im 150 mM Citratpuffer bei pH 6,0, im 100 mM Phosphatpuffer bei pH 6,5 und im 20 mM Phosphatpuffer zwischen pH 6,5 und 7. Dies könnte auf eine Abhängigkeit der Aktivität der BTA-Hydrolase von der Ionenstärke des Puffers hinweisen.

Aufgrund der Aminosäuresequenzanalyse konnte das BTA-hydrolysierende Enzym den Serin-Hydrolasen zugeordnet werden. Es zeigten sich 65% Ähnlichkeit zu der Triacylglycerol-Lipase von *Streptomyces albus* G und 62% Ähnlichkeit zu der Triacylglycerol-Acylhydrolase von *Streptomyces* sp. M11. Ein gemeinsames, typisches Merkmal aller Serin-Hydrolasen (Lipasen, Esterasen, PHB-Depolymerasen und Serin-Proteasen) stellt die hochkonservierte Aminosäuresequenz G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G des aktiven Zentrums dar (ARPIGNY et al. 1998, BRADY et al. 1990, SCHIRMER et al. 1995, ANTONIAN 1988). Bei der BTA-Hydrolase wurde die Sequenz G-H-S-M-G gefunden, wobei sich das Serin an Position 132 der Aminosäurekette befand (Kap.4.3.5.3, Bild 4.56).

Die BTA-Hydrolase verfügt mit 261 Aminosäuren über genauso viele Aminosäuren wie die beiden ihr ähnlichen Streptomyces-Lipasen aus *Streptomyces albus* G und *Streptomyces* sp. M11. Dabei variiert die Zusammensetzung der Aminosäuren nur geringfügig. Auffällig sind lediglich die Unterschiede im Anteil der Aminosäuren Asparagin/Asparaginsäure, Serin, Threonin und Isoleucin (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2 Vergleich der Aminosäurezusammensetzung und des Molekulargewichtes der BTA-Hydrolase (*T. fusca*) mit denen verschiedener Lipasen und Cutinasen unterschiedlicher Mikroorganismen.

Aminosäure	<i>T. fusca</i> <sup>a</sup>	Lipasen		Cutinasen		
		<i>S. sp.</i> M11 <sup>b</sup>	<i>S. albus</i> G <sup>c</sup>	<i>S. scabies</i> <sup>d</sup>	<i>P. putida</i> <sup>e</sup>	<i>F. solani</i> <sup>f</sup>
Alanin	25	24	23	29	28	25
Asparagin / Aspartat	26	18	22	31	27	24
Cystein	2	2	2	2	4	3
Prolin	19	19	22	17	18	12
Glutamin / Glutamat	16	15	15	18	29	18
Arginin	15	16	16	9	16	14
Phenylalanin	9	9	9	7	11	7
Serin	26	30	23	23	18	18
Glycin	22	24	25	33	34	26
Threonin	20	31	30	22	16	11
Histidin	6	4	3	2	5	3
Isoleucin	17	11	9	13	9	10
Valin	13	13	17	13	15	13
Tryptophan	4	4	4	1	1	n.b.
Lysin	8	7	6	8	1	11
Leucin	20	21	22	19	24	21
Tyrosin	10	11	10	6	9	6
Methionin	3	2	3	1	4	1
Gesamtsumme:	261	261	261	254	269	223
Molekulargewicht	28,2 kDa	27,9 kDa	27,9 kDa	k.A.	30,0 kDa	k.A.
Anteil hydrophober Aminosäuren	42%	39,5%	41,7%	40,6%	40,9%	41,7%

<sup>a</sup> *Thermomonospora fusca* DSM 43793 (Kap.4.3.5.3)

<sup>b</sup> *Streptomyces* sp. M11 (Nr. Q56008, SP-TREMBL Datenbank, Release 7.0, 08/1998)

<sup>c</sup> *Streptomyces albus* G (Nr. Q59798, SP-TREMBL Datenbank, Release 7.0, 08/1998)

<sup>d</sup> *Pseudomonas putida* (SEBASTIAN und KOLATTUKUDY 1988)

<sup>e</sup> *Streptomyces scabies* (KOLATTUKUDY 1985)

<sup>f</sup> *Fusarium solani* f. pisi, Cutinase „Cut A“ (KOLATTUKUDY 1985)

n.b. nicht bestimmt

k.A. keine Angaben

Der Anteil hydrophober Aminosäuren der BTA-Hydrolase liegt mit 42% an der oberen Grenze der Vergleichswerte aus der Literatur (SCHMIDT-DANNERT 1994, ZIEMANN-NÖTKE 1995). Der hohe Gehalt an hydrophoben Aminosäuren wird dabei in Zusammenhang gebracht mit der Tendenz vieler Lipasen, große Aggregate zu bilden und stark an unpolare Oberflächen zu adsorbieren (FISCHER und KLEBER 1987, JAEGER et al. 1992, SCHMIDT-DANNERT et al. 1994). So könnte die Hydrophobizität der BTA-Hydrolase die Ursache für die beobachtete starke Bindung des Enzyms an die Sepharose-Matrix ohne Liganden sein (Kap.4.3.3.3).

Verblüffend ist die Ähnlichkeit der Aminosäurezusammensetzung der BTA-Hydrolase und der Lipasen zu den Cutinasen von *Streptomyces scabies*, *Pseudomonas putida* und *Fusarium solani f. pisi* (Tabelle 5.2), wodurch sich die Frage stellt, welcher der beiden Enzymgruppen die BTA-Hydrolase zuzuordnen ist.

Nach CARLSEN (1994) können Enzyme, die als Lipasen agieren, in bestimmten Fällen auch als Esterasen und Cutinasen agieren. Cutinasen sind Serinhydrolasen, die für primäre Alkoholester, den hauptsächlichen Bindungen in Cutin, spezifisch sind (MURPHY et al. 1996). Sie sind fähig, Cutin, die unlösliche Lipid-Polyester-Matrix der Pflanzenoberflächen, und Triglyceride zu hydrolysieren. Es sind  $\alpha/\beta$ -gefaltete Proteine, deren aktives Zentrum aus der katalytischen Triade Serin, Histidin und Asparaginsäure besteht. Die Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums (G-Y-S-Q-G) entspricht der Sequenz, die im allgemeinen in Lipasen vorkommt (G-H/Y-S-X-G). Außerdem existieren strukturelle Homologien zwischen Cutinasen und Lipasen (MARTINEZ et al. 1992). Sie unterscheiden sich jedoch von klassischen Lipasen, da sie keine Grenzflächenaktivierung zeigen. Sie sind aktiv sowohl gegenüber löslichen als auch gegenüber emulgierten Triglyceriden und bilden dementsprechend eine Brücke zwischen „echten“ Esterasen und „echten“ Lipasen (MARTINEZ et al. 1994).

Die von MURPHY et al. (1996) aufgestellte Regel, wonach pilzliche Cutinasen im allgemeinen Molekulargewichte zwischen 22 und 25 kDa besitzen und ihr pH-Optimum meist im Alkalischen um pH 9-12 liegt, während pilzliche Lipasen zumeist größer sind (> 30 kDa) und typischerweise Optima im neutralen oder sauren Bereich aufweisen, ist nicht direkt auf bakterielle Lipasen und Cutinasen anwendbar. So trifft sie zwar zunächst auf die BTA-Hydrolase und Lipasen von *Pseudomonas sp.* KWI-56, *Pseudomonas cepacia* und *Staphylococcus aureus* 226 zu, doch zeigen die Lipasen von *Acinetobacter calcoaceticus* 69 V, *Bacillus thermocatenulatus* und *Bacillus sp.* sowie die bakterielle Cutinase von *Pseudomonas putida* deutliche Ausnahmen von dieser Regel an (Tabelle 5.3).

Die eindeutigen Beweise für die Entscheidung, ob die BTA-Hydrolase eine Lipase oder Cutinase ist (entweder Nachweis der Grenzflächenaktivierung oder der Nachweis der Hydrolyse des Cutins), stehen noch aus. Aufgrund des Alignments, das große Sequenzho-

mologien zu den beiden *Streptomyces*-Lipasen, aber keine Sequenzhomologien zu bekannten Cutinasen erbrachte, ist jedoch die Wahrscheinlichkeit hoch, daß die BTA-Hydrolase eine Lipase ist.

Tabelle 5.3 Vergleich der Molekulargewichte und pH-Optima verschiedener Hydrolasen.

Enzyme verschiedener Organismen	MW (kDa)	pH-Optimum	Quelle
<u>Lipase</u>			
<i>Pseudomonas</i> sp. KWI-56	33	5,5 - 7	IIZUMI et al. 1990
<i>Pseudomonas cepacia</i>	36,5	5,5 - 6,5	SUGIHARA et al. 1992
<i>Staphylococcus aureus</i> 226	34	6	MURAOKA et al. 1982
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 69 V	30,5	8	FISCHER UND KLEBER 1987
<i>Bacillus thermocatenulatus</i> DSM 730	16	8	SCHMIDT-DANNERT et al. 1994
<i>Bacillus</i> sp.	22	5,5 - 7,2	SUGIHARA et al. 1991
<u>Cutinase</u>			
<i>Pseudomonas putida</i>	30	8,5 - 10,5	SEBASTIAN und KOLATTUKUDY 1988
<u>BTA-Hydrolase</u>			
<i>Thermomonospora fusca</i> DSM 43793	28,2	6 - 6,5	Kap.4.3.5.6 und Kap.4.3.5.1

Die BTA-Hydrolase zeigte gleichmäßig hohe Aktivitäten gegenüber Triglyceriden mit relativ kurzkettigen Fettsäuren in der Reihenfolge  $C_2 = C_4 = C_6 > C_8 > C_{10}$ . Triolein ( $C_{18}$ ) wurde gleichfalls hydrolysiert, doch um einen Faktor von 20 schlechter als Tributyrin ( $C_4$ ). In der Literatur wird zur Charakterisierung von Lipasen die Aktivität der Enzyme gegenüber Triglyceriden mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen dargestellt. Ein Vergleich der Literaturangaben zeigt, daß einige Lipasen besser Triglyceride mit kurzkettigen Fettsäuren ( $C_2$ - $C_6$ ) (SUGIHARA et al. 1991), andere besser die Triglyceride mit Fettsäuren mittlerer Kettenlängen ( $C_{10}$ ,  $C_{12}$ ) zu hydrolysieren vermögen (MURAOKA et al. 1982, SUGIHARA et al. 1992), also keine einheitlichen Abhängigkeiten bestehen. SUGIURA und ISOBE (1975) wiesen darauf hin, daß die Substratspezifität gegenüber einzelnen Triglyceriden nicht nur von der chemischen Struktur, sondern auch von dem physikalischen Zustand des Substrates abhängig ist. Da Widersprüchlichkeiten aus unterschiedlichen Versuchsdurchführungen resultieren können, warnen MURAOKA et al. (1982) vor der Interpretation der Signifikanz des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge von Triglyceriden. Nach ihren Erfahrungen unterscheiden sich die Eigenschaften bakterieller Lipasen selbst dann, wenn diese Lipasen von Bakterien derselben Art stammen. Da im allgemeinen aber Triolein ( $C_{18}$ ) als typisches Substrat „echter“ Lipasen anerkannt ist (ARPIGNY et al. 1998), wurde dieses Kriterium zur Abgrenzung der BTA-Hydrolase gegenüber Esterasen herangezogen (Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4 Aktivität verschiedener Enzyme gegenüber Tributyrin und Triolein.

Organismus	Tributyrin	Triolein	Quelle
<u>Esterase</u>			
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> DSM 639	+	-	ARPIGNY et al. 1998
<u>Lipase</u>			
<i>Pseudomonas</i> sp. KWI-56	+	+	IIZUMI et al. 1990
<i>Staphylococcus aureus</i> 226	++	+	MURAOKA et al. 1982
<u>BTA-Hydrolase</u>			
<i>Thermomonospora fusca</i> DSM 43793	++	+	Kap.4.3.5.8

Die Untersuchung der Substratspezifität der BTA-Hydrolase gegenüber verschiedenen Polyesterstrukturen ergab, daß das Enzym in der Lage war, sowohl aliphatisch-aromatische Copolyester als auch rein aliphatische Polyester mit unterschiedlichen Kettenlängen der Diole und Dicarbonsäuren (SP 3/13, Bionolle) und einen Polyesteramid (Bayer Tir 1874) zu spalten (Kap.4.3.5.7). Im Gegensatz zu der Hydrolyseaktivität des Gesamtorganismus (Kap.4.2.2.3) war die Aktivität des Enzyms gegenüber rein aliphatischen Strukturen höher als gegenüber dem aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyester. Diese Diskrepanz der unterschiedlichen Hydrolysegeschwindigkeiten wird vermutlich durch den Induktionsmechanismus für die Produktion der Hydrolasen hervorgerufen. In den Agarplattenversuchen wurden dem Gesamtorganismus die verschiedenen Polymere als Induktoren für die Hydrolaseproduktion angeboten. Dabei wirkten Bionolle, Bayer Tir 1874 und SP 3/13 entweder als verhältnismäßig schwache Induktoren für die BTA-Hydrolase oder sie induzierten, wie im Falle von P(3HB) beobachtet werden konnte, ganz andere Hydrolasen, die niedrigere Aktivitäten zeigten.

Während der Gesamtorganismus zur Produktion einer speziellen P(3HB)-Depolymerase fähig war, zeigte die BTA-Hydrolase keinerlei Aktivität gegenüber dem P(3HB). Ausgehend von der Annahme, daß es sich um eine Lipase handelt, stimmen diese Ergebnisse gut mit vergleichbaren Daten der Literatur überein. JAEGER et al. (1995) untersuchten 8 PHB-Depolymerasen und 5 Lipasen unter anderem auf ihre Hydrolyseaktivität gegenüber P(3HB), PCL und Bionolle (Tabelle 5.5). Keine der Lipasen hydrolysierte P(3HB). Gleiches ergaben Untersuchungen durch MUKAI et al. (1993), die neben 5 verschiedenen PHB-Depolymerasen 10 pilzliche und 6 bakterielle Lipasen auf den Abbau verschiedener Polyhydroxyalkanoate testeten. P(3HB) wurde von keiner Lipase gespalten.

Tabelle 5.5 Aktivität verschiedener Enzyme gegenüber den Polymeren Polyhydroxybuttersäure (P(3HB)), Polycaprolacton (PCL) und Bionolle (nach JAEGER et al. 1995).

Organismus bzw. Enzym	P(3HB)	PCL	Bionolle
<u>PHB-Depolymerasen<sup>a</sup></u>			
PhaZ5 <sub>Plē</sub>	++++	-	+
PhaZ2 <sub>Plē</sub>	++++	-	-
PhaZ4 <sub>Plē</sub>	+++	-	++
<u>Lipasen</u>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+++	++
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	++	+++
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	-	+	+
<u>BTA-Hydrolase<sup>b</sup></u>			
<i>Thermomonospora fusca</i> DSM 43793	-	n.b.	+++

<sup>a</sup> Dargestellt sind drei PHB-Depolymerasen aus dem Organismus *Pseudomonas lemoignei*

<sup>b</sup> Ergebnisse aus Kap.4.3.5.7

n.b.: nicht bestimmt

Aufgrund der hohen Sequenzhomologien zu zwei Lipasen der Stämme *Streptomyces* sp. M11 und *Streptomyces albus* G sowie ihrer Fähigkeit, Triolein zu spalten, handelt es sich bei der BTA-Hydrolase sehr wahrscheinlich um eine Lipase, wenn auch die endgültige Abgrenzung zu den Cutinasen noch nicht erbracht wurde. Das Enzym verfügt über ein ausgeprägt breites Substratspektrum, da es in der Lage ist, sowohl Polymere mit aromatischen Komponenten als auch mit aliphatischen Komponenten unterschiedlicher Länge sowie Polyesteramide zu spalten. Diese breite Substratspezifität stimmt mit der bereits erwähnten Theorie der „zufälligen“ Spaltung eines synthetischen Polymers mit ähnlicher Struktur natürlicher Substrate überein. Nach LENZ (1993) existieren Enzyme mit einer sehr breiten Substratspezifität für einen gegebenen Typ von funktioneller Gruppe, so daß auch Substrate mit strukturellen Variationen in der Nachbarschaft der funktionellen Gruppe umgesetzt werden.

Über die natürlichen Substrate der BTA-Hydrolase kann bislang lediglich spekuliert werden und weiterführende Untersuchungen hierzu könnten sich sehr kompliziert gestalten. So ist nach JEFFRIES (1994) z.B. noch nicht klar, ob und welche Rolle Ester mit Uronsäuren und aromatischen Säuren im Ligninabbau spielen. Zwar wurden die hauptsächlich beteiligten Xylanasen und ligninabbauenden Enzyme einiger Bakterien- und Pilzarten identifiziert, aber die Gründe für ihre Vielfältigkeit und das Spektrum ihrer Substratspezifitäten sind kaum bekannt. Bislang wurde kein Enzym gefunden, das zur Spaltung von Bindungen zwischen dem polymeren Lignin und den Kohlenhydraten fähig ist. Derartige Untersuchungen sind ganz ähnlichen Problemen unterworfen, wie sie bei Untersuchungen des Lignin- oder Hemi-

celluloseabbaus auftreten: die von natürlichen Polymeren stammenden Substrate sind oft wenig definiert, Modellverbindungen reflektieren nicht die Struktur der nativen Substanz, die Bindungen sind vielfältig und die Produkte können sehr komplex sein.



## 6 Zusammenfassung

Der mikrobielle Abbau eines anwendungstechnisch interessanten, aliphatisch-aromatischen Copolyesters aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure (BTA) wurde untersucht. Hierzu wurden polyesterspaltende Mikroorganismen aus Kompost isoliert, da die Kompostierung allgemein als vielversprechender Entsorgungsweg für bioabbaubare Kunststoffe gilt. Von insgesamt 30 BTA-hydrolysierenden Isolaten konnten 25 der Gruppe der thermophilen Actinomyceten zugeordnet werden. Diese weitverbreitet vorkommenden, myzelartig wachsenden Bakterien sind in der Natur am Abbau komplexer, hochpolymerer Strukturen wie z.B. Lignocellulosen, Paraffine, Kautschuk und Cutin beteiligt, die unter anderem Esterbindungen und aromatische Säuren enthalten. Zwei Actinomyceten-Stämme, Isolate K7a-3 und K13g, zeigten außergewöhnlich hohe Hydrolyseleistungen gegenüber dem BTA-Copolyester (BTA-Filme von ca. 45 mg desintegrierten vollständig innerhalb von 7 Tagen). Sie wurden als Stämme der Art *Thermomonospora fusca* identifiziert.

Ein Screening auf BTA-Hydrolyse, das mit der Actinomyceten-Stammsammlung der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) durchgeführt wurde, kennzeichnete die Fähigkeit zur BTA-Hydrolyse als zumeist gemeinsame Eigenschaft der Stämme einer Art. So konnte der Stamm *Thermomonospora fusca* DSM 43793 alternativ zu den eigenen Isolaten K7a-3 und K13g für Untersuchungen zum mikrobiellen BTA-Abbau sowie zur Produktion und Isolierung eines BTA-hydrolysierenden Enzyms eingesetzt werden.

Die Isolate K7a-3 und K13g hydrolysieren, abgesehen von den aliphatisch-aromatischen Copolyestern BTA 40/60 und BTA 60/40, auch rein aliphatische Polyester mit unterschiedlicher Kettenlänge der Diöle und Dicarbonsäuren (Bionolle, SP 3/13), Polyhydroxybuttersäure (P(3HB)) und ein Polyesteramid (Bayer Tir 1874). Trotz der hohen BTA-hydrolysierenden Aktivität können die Stämme K13g und DSM 43793 die Spaltprodukte des BTA-Copolyesters nur in geringem Maße für ihren Stoffwechsel nutzen (10% Abbau innerhalb von fünf Tagen). Bei den BTA-Monomeren deutet sich lediglich für das Adipat eine gewisse Metabolisierung an (3% Abbau innerhalb von sieben Tagen nach einer Lag-Phase von acht Tagen). Für den vollständigen Abbau des BTA-Copolyesters ist ein Zusammenspiel verschiedenartiger Mikroorganismen des Kompostes notwendig. Eine Metabolisierung der BTA-Monomere wurde bei Einsatz von Kompost-Mischpopulationen in respirometrischen Tests nachgewiesen.

Zur Produktion der durch den BTA-Copolyester induzierbaren, extrazellulären BTA-Hydrolase wurde der Stamm *Thermomonospora fusca* DSM 43793 in flüssigem Pepton-Mineral-

salzmedium (pH 7,0) 18 Stunden bei 55°C und 120 Upm kultiviert. Für die Reinigung des Enzyms wurde es aus dem Kulturüberstand zunächst durch Ammoniumsulfat-Fällung konzentriert, das Proteinpellet in 20 mM Citratpuffer (pH 4,0) gelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Das BTA-hydrolysierende Enzym wurde mittels Ionenaustauschchromatographie an einer UNO-S1-Säule vorgereinigt (Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten). Nach einer weiteren Dialyse gegen 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) wurde der Lösung 0,5 M Ammoniumsulfat hinzugefügt. Eine weitgehende Reinigung von nicht BTA-aktiven Proteinen erfolgte durch hydrophobe Interaktionschromatographie an einer Phenylsepharose CL-4B-Säule (Elution mit einem Stufengradienten mit 30% Isopropanol in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1). Die erzielte Ausbeute betrug 14% und die Reinheit des Enzyms wurde mittels SDS-Gelelektrophorese sowie durch isoelektrische Fokussierung kontrolliert. Es wurden eine Hauptbande mit Enzymaktivität gegenüber dem BTA-Copolyester sowie zwei nur in Spuren nachweisbaren Proteinbanden ohne entsprechende Enzymaktivität gefunden.

Die BTA-Hydrolase hat ein Molekulargewicht von 28,5 kDa (Aminosäuresequenzanalyse) und einen pI-Wert von 6,3. Ihre Aminosäuresequenz weist große Homologien zu zwei Lipasen der Stämme *Streptomyces* sp. M11 und *Streptomyces albus* G auf. Der hohe Anteil hydrophober Aminosäuren (42%) erklärt die starke Adsorption des Enzyms an die getesteten Sepharose-Matrizes und die gute Enzymwirkung auf das hydrophobe Substrat. Das pH-Optimum der BTA-Hydrolase liegt im 20 mM Phosphatpuffer zwischen pH 6,5 und 7,0 und verschiebt sich mit zunehmender Ionenstärke in den sauren Bereich (pH 6,0 im 150 mM Citratpuffer). Das Temperaturoptimum liegt bei 65°C. Nach einer Inkubation von 30 min bei 65°C zeigt das Enzym noch 100% seiner Aktivität, verliert jedoch 85% sofern die Inkubation bei 70°C erfolgt. Das Enzym bleibt über einen Zeitraum von 24 h bei 55°C stabil. Die BTA-Hydrolase ist in der Lage, sowohl Triglyceride mit relativ kurzkettigen Fettsäuren (C2 - C10) als auch Triolein (C18) zu hydrolysieren. Gegenüber dem BTA-Copolyester zeigt sie eine zehnfach höhere Hydrolyseaktivität als eine käuflich erworbene *Pseudomonas*-sp.-Lipase.

In Bezug auf verschiedene Polyesterstrukturen verfügt das isolierte Enzym über eine sehr breite Substratspezifität: es ist fähig, sowohl aliphatisch-aromatische Copolyester als auch rein aliphatische Polyester mit Diolen und Dicarbonsäuren unterschiedlicher Kettenlängen und ein Polyesteramid zu hydrolysieren. Im Gegensatz zu dem Gesamtorganismus zeigt das gereinigte Enzym keine hydrolysierende Aktivität gegenüber dem mikrobiellen Polyester Polyhydroxybuttersäure. Hieraus wird deutlich, daß sich das Abbaupotential eines Mikroorganismus aus dem Produkt der durch den Stamm produzierbaren Enzyme und der Substratspezifität der jeweiligen Enzyme ergibt.

Das weit verbreitete Vorkommen der thermophilen Actinomyceten in Kombination mit den hohen Hydrolyseleistungen und dem breiten Spektrum hydrolysierbarer Polyesterstrukturen

---

kennzeichnet die beschriebenen Stämme als interessante Organismen für den Einsatz in grundlegenden Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit von Polyestern.

## 7 Material und Methoden

### 7.1 Eingesetzte Polymere und ihre Verarbeitung

#### 7.1.1 Materialien

Die Herkunft der verwendeten Polymere, ihre Zusammensetzungen, Schmelztemperaturen, durchschnittlichen Molmassen und der Einsatz in den unterschiedlichen Versuchen sind in Tabelle 7.1 zusammengefaßt.

Tabelle 7.1 Parameter der verwendeten Polymere

Polymer <sup>a</sup>	Zusammensetzung <sup>b</sup>			T <sub>m</sub> <sup>c</sup> (°C)	M <sub>w</sub> <sup>d</sup> (g/mol)	Einsatz als
	Diol	aromatische Komponente (mol %)	aliphatische Komponente (mol %)			
BTA 40/60	BD	TS (40)	AD (60)	99	47600	Film
BTA 45/55	BD	TS (45)	AD (55)	119	66000	Film, Dispersion
BTA 60/40	BD	TS (60)	AD (40)	147	45000	Film
SP 3/13	PD		BS	72	41500	Film
Bayer Tir 1874	BD		AD (40) CL (60)	125	n.b. <sup>e</sup>	Film
P(3HB)			3-HB	175	>800000	Film, Pulver
Bionolle	BD		BS	113	66000	Film

<sup>a</sup> Herkunft der Polymere siehe Kap.7.5

<sup>b</sup> (BD) 1,4-Butandiol, (PD) 1,3-Propandiol, (TS) Terephthalsäure, (AD) Adipinsäure, (BS) Bernsteinsäure, (CL) Caprolactam, (3-HB) 3-Hydroxybuttersäure, (BS) Bernsteinsäure

<sup>c</sup> T<sub>m</sub>, Schmelztemperatur (Differential Scanning Calorimetry; Mettler DSC 12E, Mettler-Toledo, Giessen, Schweiz)

<sup>d</sup> M<sub>w</sub>, Gewichtsmittel des Molekulargewichtes (Gelpermeationschromatographie, basierend auf einer Kalibrierung mit Polystyrol)

<sup>e</sup> n.b., nicht bestimmt

#### 7.1.2 Herstellung von Polymerfilmen durch Schmelzpressen

Um mit definierten Probekörpern arbeiten zu können, wurden Polyesterfilme durch ein Schmelzpreß-Verfahren hergestellt. Als Preßwerkzeug diente eine Hydraulikpresse (Ident.-Nr. 062566, Perkin Elmer, Überlingen) mit zwei thermostatisierbaren Metallplatten (PIN 15515, Specac, England) sowie verschiedene Distanzringe, die die Filmdicke festlegten. Das Polymermaterial (dickere Filmstücke, Granula oder Pulver) wurde zwischen mit Teflon beschichtetem Papier im Preßring auf eine Preßtemperatur erwärmt, die jeweils ca.

5°C unterhalb der Schmelztemperatur der jeweiligen Polyester (siehe Tabelle 7.1) lag. Durch Aufbringen eines Gewichtes von 2 t wurde das Material 2 min lang zu Filmen gepreßt. Mit Hilfe von Stanzeisen wurden Filme mit definierten Durchmessern ausgestanzt, so daß definierte Oberflächen entstanden.

Tabelle 7.2 Durchmesser und von Mikroorganismen angreifbare Filmoberflächen der in den verschiedenen Tests verwendeten Polymerfilme.

Test	Filmdurchmesser	angreifbare Filmoberfläche
Hydrolysetests in Kultur	2,5 cm	
auf Agarplatten		4,91 cm <sup>2</sup>
in Flüssigkultur		9,82 cm <sup>2</sup>
Enzymtest (Macro-Methode)	2,5 cm	9,82 cm <sup>2</sup>
Enzymtest (Reagenzglas-Methode)	0,9 cm	1,27 cm <sup>2</sup>
Enzymtest (Titration)	0,9 cm (2 Filme)	1,27 cm <sup>2</sup> (2,54 cm <sup>2</sup> )
Enzymtest (UV-Absorptionstest)	0,5 cm (4 Filme)	0,39 cm <sup>2</sup> (1,56 cm <sup>2</sup> )

Alle Filme wurden in wäßrigem 70%igem (v/v) Ethanol 30 min unter Rühren entfettet, bei Raumtemperatur 24 h im Vakuumtrockenschrank getrocknet und das Gewicht mittels Analysenwaage (AE 260 Delta Range®, Mettler, Giessen) auf ± 0,3 mg bestimmt.

### 7.1.3 Sterilisation der Polymerfilme

#### 7.1.3.1 UV-Licht (WALLHÄUSSER 1984)

Die Polymerfilme (Ø = 2,5 cm) wurden der Bestrahlung einer UV-Lampe (UVC 30, Heraeus Holding GmbH, Hannover: 254 nm, 6 W/cm<sup>2</sup> bei einem Abstand von 20 cm) in einem Bestrahlungsabstand von 15 cm und auf einer Bestrahlungsfläche von 18 cm x 38 cm für jeweils 15 min pro Filmseite ausgesetzt. Diese Methode der Sterilisierung wurde lediglich für Polymerfilme, die im Agarplattentest eingesetzt wurden, angewandt.

#### 7.1.3.2 Wasserstoffperoxidlösung (WALLHÄUSER 1984)

Für die Hydrolyse von BTA-Filmen in Flüssigkultur wurden die Filme (Ø: 2,5 cm) zunächst gewogen und anschließend durch zweimaliges Durchstechen mit Edelstahldrähten (Länge: 2,5 cm, Durchmesser: 1 mm) zur Beschwerung versehen, um ein Haften der stark hydrophoben Filme an den Glaswänden der Kulturgefäße zu verhindern. Die Filme wurden einzeln in kleinen Petrischälchen (Ø: 35 mm, Greiner, Frickenhausen) mit 10%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung überschichtet und 2 h sterilisiert, wobei sie von Zeit zu Zeit mit einer sterilen Pinzette unter die Flüssigkeitsoberfläche gedrückt bzw. gewendet wurden. Nach dem Absau-

gen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung wurden die Filme über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und in drei aufeinanderfolgenden 500-ml-Schottflaschen, die randvoll mit sterilem A. deion. gefüllt waren, gewaschen. Anschließend wurden sie in die Kulturkolben gegeben.

Für den Enzymtest mittels Reagenzglas-Methode wurden kleinere BTA- bzw. Polymerfilme ( $\varnothing = 0,9$  cm) zunächst in mit Alufolie verschlossenen sterilen Bechergläsern 2 h unter Rühren in 10%iger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung sterilisiert, in drei aufeinanderfolgenden 500-ml-Schottflaschen, die randvoll mit sterilem A. deion. gefüllt waren, gewaschen und in sterilen Petrischalen auf Filterpapier vakuumgetrocknet. Unter sterilen Bedingungen erfolgte die Gewichtsbestimmung auf  $\pm 0,3$  mg mittels Analysenwaage (AE 260 Delta Range<sup>®</sup>, Mettler, Giessen), bevor die Filme in kleine sterile Reagenzgläser mit Alukappen gegeben und mit 1 bis 2 ml der Enzymproben versetzt wurden.

#### **7.1.3.3 Autoklavieren von PHB-Filmen**

Da Polyhydroxybuttersäure eine Schmelztemperatur von  $180^\circ\text{C}$  hat, konnten Filme aus diesem Material nach der Entfettung (30 min, 70%ige wässrige Ethanol-Lösung), Vakuumtrocknung und Bestimmung des Gewichtes in Glaspetrischalen bei  $121^\circ\text{C}$  und 1 bar Überdruck 20 min autoklaviert (Matachana, Zirbus, Osterode) werden, ohne dabei ihre Form und damit ihre definierte Oberfläche zu verlieren.

## **7.2 Mikrobiologische Untersuchungen**

### **7.2.1 Mikroorganismen**

Kompostproben, die als Quellmaterial zur Gewinnung der mikrobiellen Populationen dienten, wurden aus der Heißrottephase belüfteter Mieten (Grünabfälle wie Baum- und Strauchschnitt, Gras und Laub) der Kompostierungsanlage Watenbüttel, Braunschweig, bezogen. Für ein Screening nach BTA-hydrolysierenden Enzymaktivitäten von Actinomyceten und Streptomyceten wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. R.M. Kroppenstedt 1328 Stämme (Tabelle 9.2, Anhang) der Stammsammlung der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) eingesetzt.

### **7.2.2 Medien**

#### **7.2.2.1 Allgemeines**

Die Sterilisation der Medien erfolgte bei  $121^\circ\text{C}$  und 1 bar Überdruck 20 min im Autoklaven (Matachana, Zirbus, Osterode). Die pH-Werte wurden vor der Sterilisierung mit 0,1 M

Natronlauge oder Salzsäure eingestellt. Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium Agar (20 g/l) hinzugefügt.

Um dem Austrocknen der Agarplatten durch die Inkubation bei Temperaturen > 45°C vorzubeugen, wurde ein Medienvolumen von 40 ml pro Agarplatte eingesetzt. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte in verschlossenen Polyethylenbeuteln, die zwar gasdurchlässig, aber feuchtigkeitsdicht sind (MCCARTHY und CROSS 1984).

### 7.2.2.2 Medien für das Screening und für die Hydrolysetests

#### Mineralsalzmedien MinB, MSA und MSV

Im Hydrolysetest auf Agarplatten (Kap.7.2.3.3) wurden unter anderem drei verschiedene Mineralsalzmedien eingesetzt, um den unterschiedlichen Nährstoffansprüchen der Organismen gerecht zu werden. Die Zusammensetzung dieser Medien wird in Tabelle 7.3 angegeben.

Tabelle 7.3 Zusammensetzung der Mineralsalzmedien bezogen auf einen Liter A. deion.

Substanz	MinB	MSA	MSV
Quelle:	(DIN 53749)		(DIN V 54900-2)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g	0,7 g	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,7 g	3,75 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	6,97 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g	0,7 g	22,5 mg
NaCl	0,5 g	siehe SP2	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,0 g	1,0	-
NH <sub>4</sub> Cl	-		0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	-		27,5 mg
Spurenelementlösung*			
SP1	1,0 ml	-	-
SP2	-	1,0 ml	-
SP3	-	-	1,0 ml
Vitaminlösung*	-	-	1,0 ml
pH-Wert	7,0	7,0	7,0

\* Spurenelement- und Vitaminlösungen siehe Kap.7.2.2.4

#### Kompostextrakt-Medium (KEA)

Zur Herstellung des Kompostextraktes wurden 100 g Kompost mit 1 l A. deion. versetzt und 20 h bei gelegentlichem Rühren stehengelassen. Grobe Partikel wurden zunächst mit Hilfe eines Siebes entfernt. Die feineren Kompostpartikel wurden abzentrifugiert (Suprafuge 22, 7800 g, 15 min, 20°C). Der Überstand mußte - sofern Partikel aufschwammen - durch einen

Faltenfilter (5952, Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert werden. Im Abstand von 2 Tagen wurde der Extrakt dreimal 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Die Lagerung zwischen dem Autoklavieren erfolgte bei 30°C (Tyndalisieren). Der pH-Wert wurde vor dem zweiten Autoklavieren auf  $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$  eingestellt.

#### MSV/Pepton(„x“%)-Medium

Dem flüssigen MSV-Medium (Tabelle 7.3) wurden 1 bis 50 g/l Pepton aus Sojamehl hinzugefügt.

#### DSM-Screening-Medium

Dem MSV-Medium (Tabelle 7.3) wurden 15 g/l Agar, 10 g/l GYM-Medium (Kap.7.2.2.3, ohne  $\text{CaCO}_3$ ) und 1 g/l BTA-Feinstpartikel (BTA 45/55, Dispersion, Kap.7.5) hinzugefügt.

### **7.2.2.3 Medien für die Isolierung und Stammhaltung**

#### Nutrient Broth (NB)

In 1000 ml A. deion. wurden 8 g Nutrient Broth (Difco 0003-17-8) gelöst und der pH-Wert auf  $7,0 \pm 0,2$  eingestellt. Das Medium enthält 5 g Pepton und 3 g Fleischextrakt pro Liter.

#### Tryptic Soy Broth (TSB)

In 1000 ml A. deion. wurden 30 g Tryptic Soy Broth (Merck 5459) gelöst. Ein Liter dieses Mediums enthält 17 g Pepton aus Casein, 3 g Pepton aus Sojamehl, 2,5 g D(+)-Glucose, 5 g NaCl und 2,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und hat einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,2$ .

#### Standard-II-Soy (StIIsoy)

In 1000 ml A. deion. wurden 15 g Standard-II-Nährbouillon (Merck 7884), 5 g Pepton aus Sojamehl (papainisch verdaut) und 5 g Hefeextrakt gelöst und der pH-Wert auf  $7,2 \pm 0,2$  eingestellt.

#### Stärke-Casein- $\text{KNO}_3$ -Medium (SCK) (KÜSTER und WILLIAMS 1964)

In 1000 ml A. deion. wurden 10 g Stärke, 0,3 g Casein, 2 g  $\text{KNO}_3$ , 1 g NaCl, 0,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,7 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  und 1 ml Spurenelementlösung SP4 (Kap.7.2.2.4) gelöst und der pH-Wert auf  $7,2 \pm 0,2$  eingestellt.

#### Streptomyces-Medium (GYM<sup>+</sup>) (GREINER-MAI et al. 1987)

In 1000 ml A. deion. wurden 4 g Glucose, 4 g Hefeextrakt, 10 g Malzextrakt gelöst und 2 g  $\text{CaCO}_3$  suspendiert. Der pH-Wert wurde auf  $7,2 \pm 0,2$  eingestellt.



Standard-I-Malzextrakt-Medium (StIME)

In 1000 ml A. deion. wurden 25 g Standard-I-Nährbouillon (Merck 7882) und 10 g Malzextrakt gelöst sowie 2 g  $\text{CaCO}_3$  suspendiert und der pH-Wert auf  $7,2 \pm 0,2$  eingestellt.

Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI)

In 1000 ml A. deion. wurden 37 g Hirn-Herz-Bouillon (Merck 10493) gelöst. Ein Liter dieses Mediums enthält 27,5 g Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt und Peptone), 2 g D(+)-Glucose, 5 g NaCl und 2,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und hat einen pH-Wert von  $7,4 \pm 0,2$ .

„Fetter“ Kompostextrakt Agar (KEA<sup>++</sup>)

Es wurden 0,5 g Hefeextrakt, 1 g D(+)-Glucose und 20 g Agar in 1 l Kompostextrakt (Kap.7.2.2.2) gelöst.

**7.2.2.4 Spurenelement- und Vitaminlösungen**Spurenelementlösung SP1

In 100 ml A. deion. wurde 1 g  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

Spurenelementlösung SP2

In 100 ml A. deion. wurden 0,5 g NaCl, 0,2 g  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  und 0,1 g  $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

Spurenelementlösung SP3

Nacheinander wurden in 10 ml 25%iger Salzsäure 2,297 g  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,07 g  $\text{ZnCl}_2$ , 0,1 g  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,006 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,003 g  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,003 g  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,24 g  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,036 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,033 g  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  und 0,026 g  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Danach wurde mit A. deion. auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

Spurenelementlösung SP4

In 1000 ml A. deion. wurden 1 g  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  und 0,1 g  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  gelöst.

Vitaminlösung

In 100 ml A. deion. wurden 0,6 mg (+)-Biotin, 2 mg Niacinamid, 2 mg p-Aminobenzoat, 1 mg D-Pantothensäure, 10 mg Pyridoxalhydrochlorid, 5 mg Vitamin B12, 2 mg Folsäure, 5 mg Riboflavin, 5 mg D,L-6,8-Dithiooctansäure (Liponsäure) und 1 mg Thiaminiumchloridhydrochlorid gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert (Minisart NML, 0,2  $\mu\text{m}$ , Sartorius, Göttingen) und bis zum Gebrauch in Portionen à 0,5 ml bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

## 7.2.3 Isolierung polyesterspaltender Reinstämme

### 7.2.3.1 Herstellung der Inokula

In Tabelle 7.4 wird eine Übersicht über die Herkunft und Vorbereitung der Inokula für die Anreicherungskulturen K1 bis K13 gegeben. Eine detaillierte Beschreibung der Anreicherungen und Isolierungen folgt in den nachfolgenden Kapiteln.

Tabelle 7.4 Herkunft und Vorbereitung der Inokula für die unterschiedlichen Anreicherungskulturen.

Herkunft der Inokula						Anreicherungskultur	
Proben- nahme	Kompostreaktor					Nr.	Temp. (°C)
	Typ	Inkubation		Polymere	Art des Inokulums *		
		Temp. (°C)	Zeit (Wochen)				
3'95	3 L	60	12	BTA 40/60	BF	K1	55
3'95	3 L	60	12	BTA 40/60	KE	K2	55
3'95	Inokulum hergestellt aus frischem Kompost				KE	2/5	55
6'95	3 L	60	4	BTA 40/60	BF	K3	55
6'95	3 L	60	12	BTA 40/60	BF	K4	55
9'95	1 L	20	10	BTA 40/60	KE	K5	20
9'95	1 L	40	8	BTA 40/60	KE	K6	55
9'95	1 L	60	2	BTA 40/60	BF	K7	55
9'95	Inokulum hergestellt aus frischem Kompost				KE	K8	40
9'95	Inokulum hergestellt aus frischem Kompost				KE	K9	55
8'95	3 L	60	8	cellulosehaltige Polymere	KE	K10	40
8'95	3 L	60	8	cellulosehaltige Polymere	KE	K11	55
10'95	Inokulum hergestellt aus frischem Kompost				KE	K12	40
10'95	Inokulum hergestellt aus frischem Kompost				Ac-Ka	K13	55

\* (BF) Biofilm, (KE) Komposteluat, (Ac-Ka) Actinomyceten-Kompostanreicherung

### Biofilme

BTA-Filme wurden in Labor-Kompostreaktoren eingegraben (Anreicherungskulturen K1, K3, K4, K7). Die auf den BTA-Filmen nach verschiedenen langen Inkubationszeiten (2, 8, 12 Wochen) bei unterschiedlichen Temperaturen (20°C, 40°C, 60°C) gebildeten Biofilme wurden abgekratzt und in ca. 2 ml 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) suspendiert.

### Komposteluate

Die Herstellung der Komposteluate erfolgte entweder aus frischen Kompostproben (Anreicherungskulturen 2/5, K8, K9, K12) oder aus Proben durchmischten Kompostes der Labor-Kompostreaktoren, in denen zuvor BTA-Filme (Anreicherungskultur K2, K5, K6) oder Polymere auf Cellulosebasis über mehrere Wochen eingegraben waren (Anreicherungskulturen K10 und K11). Dazu wurde 10 g Kompostmaterial mit 90 ml 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) versetzt, 30 min bei Raumtemperatur gerührt und durch einen Faltenfilter (5952, Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert.

### CaCO<sub>3</sub>-Anreicherung von Actinomyceten im Kompostsubstrat

Eine luftgetrocknete Kompostprobe wurde mit CaCO<sub>3</sub> versetzt und 10 Tage in wassergesättigter Atmosphäre bei 20°C inkubiert. Auf diese Weise wird nach EL-NAKEEB und LECHE-VALIER (1963) eine bis zu 100 mal höhere Actinomyceten-Keimzahl im Vergleich zur Kontrolle ohne Kalk erhalten. Aus der so vorbehandelten Kompostprobe wurde, wie oben beschrieben, ein Eluat hergestellt und dieses als Inokulum für die Anreicherungskultur K13 verwendet.

## **7.2.3.2 Anreicherung und Isolierung der Reinstämme**

### Anreicherung und Isolierung mit Zwischenschritt in Flüssigkultur

Für die Anreicherungskulturen K1, K2, K3 und 2/5 wurde mit den entsprechenden Inokula (Kap.7.2.3.1) zunächst flüssiges Mineralsalzmedium (MinB) mit BTA-Filmen als einziger Energiequelle beimpft, bei 55°C inkubiert und im Abstand von 2 Wochen in frischem Medium subkultiviert. Anschließend wurden mit diesen Kulturen BTA-Filme auf Kompostextrakt-Agar (KEA) beimpft.

Die Isolierung BTA-hydrolysierender Stämme erfolgte durch Abimpfen biologischen Materials von Bereichen an denen eine Zerstörung der BTA-Filme erkennbar war und wiederholter Subkultivierung sowohl auf „fetttem Kompostextrakt“- (KEA++) als auch auf NB- und TSB-Agar. Die erhaltenen Reinstämme wurden auf BTA-Hydrolyse (Kap.7.2.3.3) getestet.

### Direkte Anreicherung und Isolierung auf Agarplatten

Für die Anreicherungskulturen K4 bis K12 wurden BTA-Filme auf Kompostextrakt- (KEA) und Mineralsalz-Agarplatten (MinB, MSA) mit den jeweiligen Inokula (Kap.7.2.3.1) beimpft und zwei Wochen bei 55°C inkubiert. Die Subkultivierung erfolgte durch wiederholtes Abkratzen der sich bildenden Biofilme und Beimpfen frischer BTA-Filme auf den gleichen Agarmedien.

Die weitere Isolierung von Kolonien auf Agarplatten erfolgte wie weiter oben beschrieben. Es wurden jedoch zusätzlich spezielle Nährböden (SCK, StIIsoy, GYM<sup>+</sup>, StIME, BHI) und

besondere Impftechniken (Nutzung von sterilen Zahnstochern oder Impflanzetten zum Abimpfen hydrophober Sporen oder lederartiger Kolonien) zur Isolierung von Actinomyceten eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 55°C.

Für die Anreicherungskultur K13 wurde das in Kap.7.2.3.1 beschriebene Inokulum verdünnt und direkt auf speziellen Isolierungsmedien für Actinomyceten (SCK, StIIsoy GYM<sup>+</sup>, StIME, BHI) ausplattiert. Durch Subkultivierung von Einzelkolonien wurden Reinkulturen erhalten, die direkt in den BTA-Hydrolysetest (Kap.7.2.3.3) eingesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 55°C.

### 7.2.3.3 Hydrolysetest mittels Agarplattenmethode

Als Indikator für die Polymerspaltung wurde der Gewichtsverlust von mit Reinstämmen beimpften Polymerfilmen auf Agarplatten über einen Versuchszeitraum von 2 Wochen bestimmt. Es wurden Polymerfilme mit definierten Oberflächen (Durchmesser: 2,5 cm, Fläche einer Filmseite: 4,91 cm<sup>2</sup>) aber leichten Unterschieden im Anfangsgewicht (40 - 50 mg, Filmdicke: 100 - 120 µm) eingesetzt. Die Polymerfilme (3 Filme je Agarplatte) wurden in Tropfen von jeweils 100 µl einer Actinosporen- oder Bakteriensuspension gelegt (Konzentration ca. 10<sup>7</sup> ml<sup>-1</sup>). Jeder Reinstamm wurde auf drei verschiedenen Mineralsalz- (MinB, MSA, MSV) und einem Kompostextrakt-Agar (KEA) getestet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Gewichtsverlust der Filme pro Zeiteinheit und dem mikrobiellen Angriff ausgesetzter Filmoberfläche (mg Woche<sup>-1</sup>cm<sup>-2</sup>).

Es wurden stets unbeimpfte Kontrollen, d.h. Polymerfilme, die in den entsprechenden sterilen Medien über den gleichen Zeitraum inkubiert wurden, angesetzt. Diese Kontrollen zeigten keinen Gewichtsverlust, der über die methodenbedingte Meßungenauigkeit von ± 0,3 mg hinausging, so daß ein Gewichtsverlust bedingt durch rein abiotische Hydrolyse der Polyesterbindungen ausgeschlossen werden konnte.

### 7.2.4 Kultivierung der Actinomyceten in Flüssigmedien

Als Vorkultur wurden Kulturröhrchen à 5 ml TSB-Medium mit 200 µl Sporensuspension (Konzentration ca. 10<sup>7</sup> ml<sup>-1</sup>) beimpft und 18 - 24 h bei 55°C in Schräglage (65-70°) auf einem Rotationsschüttler (120 Upm) inkubiert. Bei pelletartigem Wachstum in der Vorkultur wurde diese mittels Ultraturrax (8000 Upm, 15 s) homogenisiert. Die Hauptkulturen wurden 1%ig mit der Vorkultur beimpft und gleichfalls bei 120 Upm und 55°C inkubiert. Als Kulturgefäße dienten mit Alukappen verschlossene Weithals-Erlenmeierkolben ohne Schikanen, in die bis zu einer Füllhöhe von 1,5 bis max. 2 cm Medium gefüllt wurde. Nach dem Abbruch der Kultur wurden die Biomasse und der Kulturüberstand durch Zentrifugation (Suprafuge 22, Heraeus Holding GmbH, Hannover, 8000 g, 20 min, 10°C) getrennt.

Die Biomasse wurde entweder zur Bestimmung des Proteingehaltes der Zellen als Wachstumsparameter oder zur Identifizierung der Actinomyceten eingesetzt. Für die letztgenannten Untersuchungen wurde sie gefriergetrocknet (Kap.7.2.5) bzw. bis zur Analyse der Fettsäuren bei -20°C gelagert. Die Kulturüberstände wurden zur Untersuchung extrazellulärer, BTA-hydrolysierender Enzyme und zur Enzymisolierung (siehe auch Kap.7.4.5.1) eingesetzt.

### **7.2.5 Gefriertrocknung**

Die Biomasse wurde in einen 50-ml-Rundkolben überführt, bei -20°C eingefroren und das Wasser im Vakuum sublimiert. Die Gefriertrocknung erfolgte bei -18°C und einem Druck kleiner als 0,01 mbar ca. 24 h an einer Vakuum-Gefriertrocknungsanlage (Beta A, Christ, Osterode). Die gefriergetrocknete Biomasse wurde in einer Reibschale zerrieben und in gut verschlossenen Plastikröhrchen bis zur Analyse gelagert.

### **7.2.6 Stammhaltung**

#### **7.2.6.1 Sporensuspensionen**

Die Actinomyceten wurden auf Agarnährmedien kultiviert, auf denen sie Luftmyzel und Actinosporen produzierten (Tabelle 9.1, Anhang). Die Luftmyzelsporen wurden in A. deion. suspendiert, dem zur besseren Benetzung der hydrophoben Sporen 0,1 g/l Tween 80 zugesetzt wurde. Derartige Suspensionen sind als Impfgut über mehrere Monate bei +4°C haltbar.

#### **7.2.6.2 Glycerinkonserven**

Kulturröhrchen à 5 ml NB-Medium wurden mit den Bakterienstämmen K1a-1 und K1a-2 beimpft und in Schräglage (65-70°) schüttelnd (120 Upm) bei 55°C inkubiert. Jeweils 1 ml der Bakteriensuspensionen wurden im Verhältnis 1:2 mit Glycerin (87%) vermischt und bei -20°C eingefroren.

Für die längerfristige Konservierung der Actinomyceten-Stämme wurde je 1 ml der Sporensuspensionen (siehe Kap. 7.2.6.1) gleichfalls 1:2 mit Glycerin (87%) vermischt und bei -20°C eingefroren. Dieses Verfahren stellt nach WELLINGTON und WILLIAMS (1978) eine schnelle und zuverlässige Methode der Konservierung von Actinomyceten dar.

Zur Reaktivierung der Kulturen wurde eine Impföse der Glycerinkonserven auf Agarnährboden ausgestrichen oder ein Kulturröhrchen mit flüssigem Medium mit einem Tropfen der Glycerinkonserven beimpft.

### 7.2.6.3 Stammhinterlegung an der DSMZ

Die Isolate K13g und K7a-3 wurden nach ihrer Identifizierung (Kap.7.2.8) als Stämme der Art *Thermomonospora fusca* an der DSMZ hinterlegt. Sie werden dort unter den Nummern DSM 44341 und DSM 44342 in der Sammlung geführt.

### 7.2.7 Lebendkeimzahl von Sporen- und Bakteriensuspensionen

Um die Ergebnisse der Hydrolyseleistungen verschiedener Organismen vergleichen zu können, wurden die Lebendkeimzahlen von Sporen- und Bakteriensuspensionen in einem bekannten Volumen einer verdünnten Probe nach dem Auskeimen makroskopisch sichtbarer Kolonien auf einem Agarmedium gezählt, so daß die „Kolonie bildenden Einheiten“ (KBE) pro ml Ausgangssuspension ermittelt und ihre Konzentration erforderlichenfalls auf ca.  $10^7 \text{ ml}^{-1}$  eingestellt werden konnten.

In 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) wurden dekadische Verdünnungsreihen der Organismensuspensionen hergestellt und aus jeder Verdünnungsstufe je 100 µl auf Agarplatten eines Komplexmediums, auf dem die entsprechenden Organismen gut kultiviert werden konnten (Tabelle 9.1, Anhang), mit Hilfe von Drigalskispateln ausgestrichen. Die Agarplatten (Dreifachbestimmung) wurden drei bis sieben Tage bei optimaler Wachstumstemperatur der Organismen inkubiert. Zur Zählung wurden Agarplatten verwendet, bei denen die Zahl der Kolonien zwischen 20 und 200 lagen.

### 7.2.8 Identifizierung ausgesuchter Actinomyceten-Stämme

Die Identifizierung der Stämme mit den besten BTA-Hydrolyseleistungen, Isolate K13g und K7a-3, erfolgte über chemotaxonomische Untersuchungen (Fettsäuren, Zucker, Phospholipide und Menachinone), die unter Anleitung im Labor von Herrn Dr. R.M. Kroppenstedt durchgeführt wurden, sowie durch partielle Sequenzierung der 16S rDNA, durchgeführt von Frau Dr. C. Spröer (beide: DSMZ, Braunschweig).

#### 7.2.8.1 Fettsäuren

Fettsäuren der Zell-Lipide können als Methylester gaschromatographisch getrennt werden. Aufgrund großer struktureller Unterschiede dieser Moleküle (Variation der Kettenlänge, Vorhandensein gesättigter und ungesättigter Fettsäuren, Vorkommen verzweigtkettiger Fettsäuren (iso- und anteiso-Fettsäuren oder Methylierungen innerhalb des Moleküls), Vorkommen von Hydroxy-Fettsäuren mit OH-Gruppen an Position 2 oder 3 des Moleküls) kann das Vorkommen und die relative Zusammensetzung der Fettsäuren eines Organismus, das Fettsäuremuster, durch Vergleich mit den Fettsäuremustern von Referenzstämmen zur Identifizierung von Bakterien herangezogen werden (BUSSE et al. 1996).

Für die Lyse der Zellen und die Freisetzung der Fettsäuren aus den zellulären Lipiden wurden 50 mg feuchte Biomasse in ein Schraubkappenröhrchen gegeben, mit 1 ml Reagenz A (45 g Natriumhydroxid, 150 ml Methanol, 150 ml A. dest.) versetzt, 10 s auf einem Reagenzglas-Schüttler gemischt, 5 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt, erneut 10 s gemischt und weitere 25 min bei 100°C inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen in einem Eisbad gekühlt. Zur Bildung der Methylester der Fettsäuren wurden 2 ml Reagenz B (325 ml 6 N HCl, 275 ml Methanol) hinzugefügt, durchmischt und 10 min auf 80°C im Wasserbad erhitzt. Nach erneuter schneller Abkühlung erfolgte die Überführung der Fettsäuren von der wäßrigen in die lipophile Phase durch Zugabe von 1,25 ml Reagenz C (200 ml Hexan, 200 ml Methyl-tert Butylether) und 10 min Durchmischen auf einem Überkopfschüttler. Die untere wäßrige Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgesogen und verworfen, während die obere lipophile Phase mit 3 ml des Reagenz D (10,8 g NaOH, 900 ml A. dest.) versetzt und 5 min auf einem Überkopfschüttler geschüttelt wurde, um den Rest an freien Fettsäuren zu extrahieren. Zwei Drittel der oberen lipophilen Phase wurden in ein GC-Röhrchen überführt und mit Septum und Metallkappe verschlossen.

Die Trennung dieser Fettsäuremethylester-Mischungen erfolgte durch Gaschromatographie mit einem 5898A Microbial Identification System (Microbial ID, Newark, Del., USA). Durch Integration wurden die Flächen der Peaks und damit die Menge der jeweiligen Fettsäuren ermittelt. Die Fettsäuren wurden durch die Standard Software des Microbial Identification System (Microbial ID) identifiziert.

### 7.2.8.2 Zucker

Bei vielen Actinomyceten kommen in Hydrolysaten ganzer Zellen verschiedene Zucker vor, die zum größten Teil Bestandteile von Zellwandpolysacchariden sind. Untersuchungen verschiedener Autoren zeigten signifikante Unterschiede im Zuckerspektrum der Actinomyceten. LECHEVALIER und LECHEVALIER (1967) zeigten, daß zur Identifizierung von Actinomyceten vier Zuckerspektren dienen können (Tabelle 7.5).

Tabelle 7.5 Zuckerspektren nach LECHEVALIER und LECHEVALIER (1967).

Zuckerspektrum	Arabinose	Galaktose	Madurose	Xylose
A	+	+	-	-
B	-	v	+	-
C	-	v	-	-
D	(v)	v	-	+

v = variabel, ( ) = geringe Mengen, - = nicht vorhanden.

Es wurden 100 mg gefriergetrocknete Biomasse in ein Hydrolyseröhrchen gegeben und 1 ml 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 2 h bei 95°C und Abkühlung von 1 h wurde die Probe in ein 50-ml-Schraubkappenröhrchen überführt und der pH-Wert durch tropfenweises Zusetzen gesättigter Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung und Kontrolle mittels pH-Meter auf pH 5,0 bis 5,5 eingestellt. Das ausgefallene BaSO<sub>4</sub> wurde abzentrifugiert (Minifuge T, Heraeus Holding GmbH, Hannover, 700 g, 10 min), der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesogen und über Nacht in einer Gefriertrocknungsanlage (Beta A, Christ, Osterode) getrocknet. Der Rückstand wurde mit 600 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen, zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 20800 g, 2 min) und der Überstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben.

Die Identifizierung der Zucker erfolgte nach dünnschichtchromatographischer Trennung anhand ihrer R<sub>f</sub>-Werte. Dazu wurden 5 µl der Probe oder des Standards strichförmig auf eine Cellulose-DC-Platte (DC-Fertigplatten aus Cellulose, ohne Fluoreszenzindikator, Merck 5716, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,1 mm) aufgetragen und insgesamt dreimal mit zwischenzeitlicher Trocknung der Platten im Laufmittel Ethylacetat/Pyridin/Wasser (100:35:25 v/v) entwickelt. Die Färbung der trockenen Platte erfolgte mit Anilinphthalat-Reagenz.

### 7.2.8.3 Phospholipide

In der Cytoplasmamembran von Eubakterien fungieren Phospholipide als Struktureinheiten. Sie bestehen aus Glycerin, das in Position 1 und 2 mit langkettigen Fettsäuren (C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub>) verestert ist und in Position 3 über Phosphodiester-Bindungen polare Gruppen trägt (z.B. Ethanolamin, Cholin, Inosit). Durch polare organische Lösungsmittel können sie extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie getrennt und durch Reagenzien gefärbt werden. Die Trennung erfolgt hauptsächlich aufgrund der unterschiedlichen polaren Gruppen.

LECHEVALIER et al. (1977) haben ein Schema für die Phospholipidzusammensetzung der Actinomyceten entwickelt, bei dem 5 Phospholipidtypen unterschieden werden (Tabelle 7.6).

Tabelle 7.6 Diagnostische Phospholipide in Actinomyceten (nach LECHEVALIER et al. 1977).

Phospholipidtyp	Phosphatidyl-Cholin	Phosphatidyl-Glycerol	Phosphatidyl-Ethanolamin	GluNU <sup>a</sup>
I	-	v	-	-
II	-	v	+	-
III	+	v	v	-
IV	-	-	v	+
V	-	+	v	+

<sup>a</sup> unbekannte Glucosamin enthaltende Phospholipide  
v variabel, + vorhanden, - nicht vorhanden



In ein 10-ml-Röhrchen mit PTFE-Schraubverschluß wurden 200 mg gefriergetrocknete Biomasse gegeben und mit 2 ml Methanol/0,3% wäßrige NaCl (100:10 v/v) sowie mit 2 ml Petroleumbenzin (Sb. 60 - 80°C) versetzt. Diese Mischung wurde 15 min auf einem Überkopfschüttler geschüttelt. Die Biomasse wurde abzentrifugiert (Minifuge T, Heraeus Holding GmbH, Hannover, 700 g, 5 min), mit 1 ml Petroleumbenzin versetzt, 15 min geschüttelt und wiederum abzentrifugiert (s.o.). Das Pellet wurde 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt und in einem zweiten Wasserbad bei 37°C 5 min abgekühlt. Nach dem Hinzufügen von 2,3 ml Chloroform/Methanol/0,3% wäßrige NaCl (90:100:30 v/v) wurde 1 h auf dem Überkopfschüttler gemischt, das Zellmaterial abzentrifugiert, der Überstand in ein 10ml Schraubkappenröhrchen überführt und aufbewahrt. Zum Zellpellet wurden erneut 0,75 ml Chloroform/Methanol/0,3% wäßrige NaCl (50:100:40 v/v) hinzugegeben, 30 min geschüttelt, die Biomasse abzentrifugiert und der Überstand in oben erwähntem Röhrchen gesammelt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Zu den drei vereinten Überständen wurden 1,3 ml  $\text{CHCl}_3$  und 1,3 ml NaCl-Lösung (3 g/l) gegeben, alles sorgfältig gemischt, zentrifugiert, die obere Phase mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Die untere Phase wurde im Rotationsverdampfer eingeeengt (Wasserbad 40°C), der Rückstand in 0,4 ml Chloroform/Methanol (2:1 v/v) aufgenommen und zur dünnschichtchromatographischen Analyse der Phospholipide eingesetzt.

Pro Extrakt wurden 20  $\mu\text{l}$  punktförmig auf 2 Dünnschichtplatten (HPTLC Fertigplatten ohne Fluoreszenzindikator, Merck 5631, Kieselgel 60) aufgetragen und zweidimensional entwickelt. Nachdem das erste Laufmittel (Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4 v/v)) die obere Markierung erreicht hatte, wurden die DC-Platten getrocknet und - um 90° gedreht - im zweiten Laufmittel (Chloroform-Eisessig-Methanol-Wasser (80:15:12:4 v/v)) entwickelt. Nach dem Trocknen der Platten erfolgte der Nachweis der Lipide mittels Sprühreagenzien.

DC-Platte I: Die Platte wurde mit Anisaldehyd-Reagenz (9 ml Ethanol, 0,5 ml Anisaldehyd, 0,5 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) besprüht. Nach dem Erhitzen der Platten (10 min bei 100°C) erscheinen mannosehaltige Substanzen gelbgrün, die übrigen Lipide violett.

DC-Platte II: Zunächst wurde die Platte mit Ninhydrin-Fertigreagenz (Merck 6758) besprüht und 5 min bei 100°C erhitzt. Substanzen mit freien Aminogruppen färben sich rot bis violett, aminohaltige Phosphoglykolipide werden nach ca. 15 min bei 140°C hellrot. Am nächsten Tag wurde dieselbe Platte mit Molybdänblau-Fertigreagenz (Sigma M-3389) besprüht. Direkt nach dem Besprühen erscheinen alle phosphathaltigen Substanzen als blaue Flecken. Durch Erhitzen auf 140°C erscheinen alle Lipide als braune Flecken auf blauem Hintergrund.

#### 7.2.8.4 Menachinone

Menachinone sind Bestandteile der Cytoplasmamembran von Bakterien und spielen bei vielen Redoxreaktionen in der Bakterienzelle eine wichtige Rolle. Durch Chloroform-Methanol werden sie vollständig aus der Zelle extrahiert und lassen sich, nach Trennung durch Dünnschichtchromatographie und HPLC, anhand ihrer UV-Spektren identifizieren. Die Analyse des Chinonsystems zur Charakterisierung von Bakterien basiert auf verschiedenen Typen von Chinonen (Ubichinone, Menachinone und ihre Derivate Dihydromenachinon und Dimethylmenachinon und Rhodochinon), der Länge der isoprenoiden Seitenketten und der Anzahl der gesättigten Isoprenoideinheiten (BUSSE et al. 1996).

In 30-ml-Schraubkappenröhrchen wurden ca. 800 mg gefriergetrocknetes Zellmaterial eingewogen und in ca. 22 ml Chloroform/Methanol (2:1 v/v) suspendiert. Über Nacht wurde mit Hilfe eines Überkopfschüttlers bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Absetzen des Zellmaterials wurde der Überstand über Rundfilter in einen 100-ml-Rundkolben überführt, während das Zellmaterial im Röhrchen ein zweites Mal mit 15 ml Chloroform/Methanol (2:1 v/v) eine Stunde extrahiert, der Überstand filtriert und gleichfalls in den Rundkolben überführt wurde. Die Einengung des Eluates erfolgte im Rotationsverdampfer bei 40°C. Der Rückstand wurde in 600 µl Aceton aufgenommen und auf eine DC-Platte (Kieselgelplastikfolie, 20/20 cm,  $G_F$  254 nm, Typ 60, Schichtdicke 0,5 mm) strichförmig aufgetragen. Es wurde im Laufmittel Petroleumbenzin (Sb. 60-80°C)/Diethylether (85:15 v/v) entwickelt und die Platte anschließend getrocknet. Durch Fluoreszenzlöschung der Chinone bei 254 nm erscheinen die Banden dunkelblau gegen den fluoreszierenden grünen Hintergrund. Die Banden wurden unter UV-Licht angezeichnet, anschließend ausgeschnitten und in einem großen Hydrolyseröhrchen mit 2 ml Diethylether herausgelöst. Die losen Kieselgelstückchen wurden mittels Pasteurpipette, die mit silanisierter Glaswolle gestopft war, abfiltriert und nochmals mit 2 ml Diethylether gespült. Der Diethylether wurde durch Einleiten von Stickstoff abgedampft, der Rückstand mit 250 µl Isopropanol aufgenommen und über Dynagard-Filter in kleine HPLC-Fläschchen filtriert. Die Trennung der Chinon-Homologen erfolgte mittels HPLC.

#### 7.2.8.5 16S rDNA-Partialsequenzanalyse

Bei der 16S rDNA-Partialsequenzanalyse wird ein Teil der 16S rRNA-Nukleotidsequenz der Probe über eine direkte Sequenzierung von 16S rDNA bestimmt, die mittels PCR jeweils aus der genomischen DNA der betreffenden Probe amplifiziert wird.

Zur Extraktion der genomischen DNA, Amplifizierung der 16S rDNA mit Hilfe der PCR-Technik und Reinigung der PCR-Produkte wurde verfahren, wie es von RAINEY et al. (1996) beschrieben ist. Die Nukleotidsequenz der gereinigten 16S rDNA wurde unter Verwendung des „ABI PRISM“ Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)

nach Anleitung des Herstellers partiell bestimmt. Es diente dazu der Primer 530r. Die DNA-Fragmente der Sequenzierungsreaktionen wurden in einem Applied Biosystems 373A DNA Sequencer elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

Die resultierenden Sequenzdaten wurden in den „alignment editor“ ae2 (MAIDAK et al. 1996) eingelesen, manuell „aligned“ und mit den 16S rRNA-Nukleotidsequenzen repräsentativer Organismen der Domäne *Bacteria* verglichen. Vergleichssequenzen wurden von der EMBL Datenbank oder der Datenbasis des RDP (MAIDAK et al. 1996) bezogen.

## **7.2.9 Mikroskopische Untersuchungen**

### **7.2.9.1 Durchlichtmikroskopie**

Flüssigkulturen der Actinomyceten wurden auf Kontaminationen mit Hilfe eines Durchlichtmikroskopes (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) kontrolliert. Dazu wurde den Kulturen unter sterilen Bedingungen Proben entnommen, die als native Präparate direkt im Phasenkontrast bei 250-400facher Vergrößerung auf Kontaminationen untersucht wurden.

### **7.2.9.2 Auflichtmikroskopie**

Für die Isolierung der einzelnen Stämme wurde ein Auflichtmikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Jena), als Hilfsmittel herangezogen, mit dem das Wachstum der Kolonien hinsichtlich makroskopischer Unterschiede auf den Agarplatten beurteilt werden konnte. Mit Hilfe dieses Mikroskops konnte gezielt Koloniematerial, das inmitten anderer Kolonien lag, abgeimpft werden.

### **7.2.9.3 Rasterelektronenmikroskopie**

Die Untersuchung des Actinomyceten-Bewuchses von BTA-Filmen aus dem Hydrolysetest mittels Agarplattenmethode (Kap. 7.2.3.3) erfolgte unter anderem durch Rasterelektronenmikroskopie (DSM 982 Gemini, Zeiss, Oberkochen). Die mit dem Isolat K13g bewachsenen BTA-Filme wurden nach einer Kulturdauer von 2 Tagen vorsichtig von der MSV-Agarplatte abgenommen, 30 min fixiert (2,5% Glutardialdehyd in 80 mM Phosphatpuffer, pH 7,1), 10 min in 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (jeweils 10 min in 10, 30, 50, 70, 90 und 2x100%) entwässert. Anschließend wurden die Proben nach dem Standardverfahren der „Kritisch-Punkt-Methode“ getrocknet (Critical Point Dryer CPD 030, Bal-Tec, Balzers Union, Liechtenstein) und mit Gold in Argon-Atmosphäre im Abstand von 50 mm bei 45 mA 50 s besputtert (Sputter-Gerät SCD 040, Bal-Tec, Liechtenstein). Die Untersuchung wurde von Herrn Dr. H. Lünsdorf (GBF, Braunschweig) durchgeführt.

#### 7.2.9.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Zum Nachweis einer Bakteriophageninfektion des Isolates K13g wurde eine 6 Tage alte Flüssigkultur in TSB-Medium (Kap.7.2.4) verwendet. Partikel aus dieser Kultursuspension wurden an Kohlefilme (ca. 2 x 2 mm), die auf die Flüssigkeitsoberfläche aufgebracht wurden, adsorbiert und nach der Methode der Negativ-Kontrastierung (VALENTINE 1968) behandelt. Dazu wurde der Kohlefilm mit den daran haftenden Partikeln auf bidestilliertem Wasser gewaschen, auf das Negativkontrastierungsmittel (eine Schwermetallsalzlösung aus Uranylacetat oder Wolframatophosphorsäure) übertragen, mit einem Neopren-gummierten Cu-Netz abgetupft und das überschüssige Kontrastierungsmittel mit Filterpapier abgesaugt. Nach Trocknung des Präparates wurde es im Transmissionselektronenmikroskop (EM 910, Zeiss, Oberkochen) betrachtet. Die Untersuchungen wurden von Herrn Dr. M. Rohde (GBF, Braunschweig) durchgeführt.

### 7.3 Nachweis der Metabolisierung von Bestandteilen des BTA-Copolyesters

#### 7.3.1 Titrimetrische Bestimmung der Kohlenstoffdioxidentwicklung

##### 7.3.1.1 Prinzip und Versuchsaufbau

Die Untersuchung der Kohlenstoffdioxidentwicklung während der Hydrolyse von BTA-Filmen auf Agarplatten durch *Thermomonospora fusca* K13g erfolgte in kleinen Standreaktoren. Das Kohlenstoffdioxid wurde nach einer Modifikation der titrimetrischen Methode der DIN V 54900-2 (1998) zur Prüfung auf vollständige Abbaubarkeit von Kunststoffen in Laborversuchen bestimmt. Der schematische Versuchsaufbau ist in Bild 7.1 dargestellt.

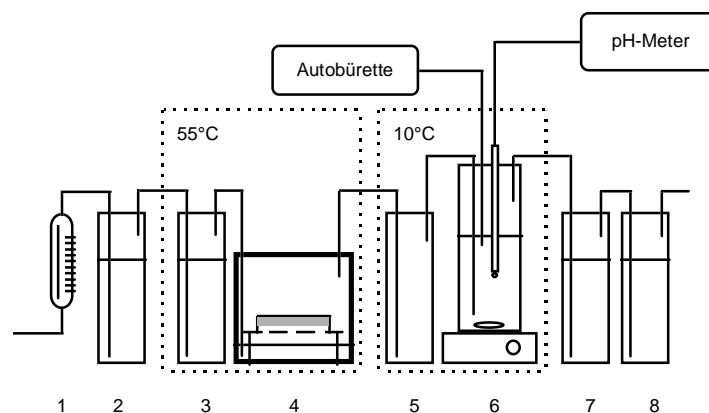


Bild 7.1 Schematischer Aufbau der Versuchsanordnung zur Bestimmung der Kohlenstoffdioxidentwicklung auf Agarplatten.  
 1 Durchflußkontrolle, 2 CO<sub>2</sub>-Abscheider (KOH (2x)), 3 Befeuchtung/Erwärmung der Druckluft (A. deion.), 4 Bioreaktor, 5 Kondensator, 6 Titrierflasche auf Magnetrührer, 7 CO<sub>2</sub>-Abscheider (Ba(OH)<sub>2</sub>), 8 CO<sub>2</sub>-Falle (KOH).

Druckluft wurde mit einer Durchflußrate von 3 l/h durch zwei in Reihe geschaltete 250-ml-Gaswaschflaschen geleitet, die mit je 150 ml 5 N KOH gefüllt waren, um das in der Druckluft enthaltene Kohlenstoffdioxid durch Überführung in Carbonat zu entfernen. Die Luft wurde anschließend zur Befeuchtung und Erwärmung durch eine 500-ml-Waschflasche mit 400 ml autoklaviertem A. deion. geleitet, bevor sie über einen Sterilfilter (Porengröße: 0,2 µm, Ø 50 mm, Millex®-FG<sub>50</sub>, Millipore, Eschborn) in den Reaktor gelangte. Bei den Reaktoren handelte es sich um Glasreaktoren mit einem Gesamtvolumen von 750 ml, die mittels Glasschliff, Gummidichtungen und Schellen mit Glasdeckeln, die mit Anschlußstopfen für Zu- und Abluft versehen waren, verschlossen wurden. Sie enthielten 250 ml steriles A. deion., durch das die Zuluft geleitet wurde, damit eine ausreichend feuchte Atmosphäre ein Austrocknen der Petrischalen, die oberhalb dieses Wasserbades kopfüber auf Edelstahlgittern lagen, verhinderte. Nach Durchströmung des Kondensators, einer als Kühlfalle dienenden leeren 250-ml-Waschflasche, in der verdunstendes Wasser aus dem Reaktor abgefangen wurde, gelangte die Luft in die Titrierflasche, die anfänglich 300 ml 5 mM NaOH (pH 11,5) enthielt. Das im Reaktor entstandene Kohlenstoffdioxid wurde absorbiert, was zum Absinken des pH-Wertes führte. Wegen der höheren Löslichkeit von Kohlenstoffdioxid bei niedrigeren Temperaturen wurde die Titrierflasche auf 10°C temperiert. Die Menge des absorbierten Kohlenstoffdioxids wurde durch Rücktitration mit 0,1 M NaOH mit Hilfe eines Autotitrationssystems (Titrationsanlage, Tabelle 7.15) auf den Anfangs-pH von 11,5 bestimmt. Zur Erfassung von eventuell durchbrechendem Kohlenstoffdioxid wurde eine Gaswaschflasche mit 100 ml einer 12,5 mM Bariumhydroxid-Lösung nachgeschaltet. Um zu verhindern, daß Kohlenstoffdioxid eventuell von außen in die Apparatur diffundiert, bildete eine 250-ml-Gaswaschflasche mit 150 ml 5 M KOH das Ende dieser Meßreihe.

### 7.3.1.2 Durchführung

In den nachfolgenden Versuchsansätzen wurden Agarplatten (bis auf den BTA-Blindwert) mit je 3 Tropfen Sporensuspension à 50 µl von *Thermomonospora fusca* K13g beimpft.

<u>Versuchsansatz:</u>	<u>Agarmedium:</u>	<u>Isolat K13g:</u>	<u>BTA-Filme:</u>
„Abbautest“	MSV	ja	ja
BTA-Blindwert	MSV	nein	ja
Mikroorganismen-Blindwert	MSV	ja	nein
Kontrolle des Versuchsaufbaus	TSB	ja	nein

Auf den Platten für die Abbautests wurden BTA-Filme in die Impftropfen gelegt; die Tropfen auf den Platten für den Mikroorganismen-Blindwert und die Kontrolle des Versuchsaufbaus wurden mit Drigalskispateln ausgestrichen. Die Agarplatten wurden ohne Deckel kopfüber

auf die Edelstahlgestelle in den Reaktoren gelegt und der Test wurde sofort gestartet. Es wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 55°C inkubiert.

Der Mikroorganismen-Blindwert diente als Kontrolle zur Detektion einer Agarverwertung durch den Mikroorganismus, um mit dem in diesem Ansatz detektierten CO<sub>2</sub> die Abbautest-Ansätze korrigieren zu können. Mit der Kontrolle des Versuchsaufbaus wurde die grundsätzliche Nachweisbarkeit der CO<sub>2</sub>-Entwicklung auf Agarplatten untersucht. Dies war notwendig, da sich die diesem Versuch zugrunde liegende Beschreibung (DIN V 54900-2, 1998) auf den Abbau von Kunststoffen in gerührten flüssigen Medien bezieht.

Mit Hilfe einer zusätzlichen MSV-Agarplatte, die mit dem Mikroorganismus und BTA-Filmen identisch zu dem Versuchsansatz „Abbautest“ (s.o.) beimpft war, jedoch nicht im Reaktor, sondern im Brutschrank inkubiert wurde, erfolgte die visuelle Kontrolle der Filmzersetzung.

### **7.3.2 Bestimmung der Kohlenstoffdioxidentwicklung mittels IR-Gasanalysator**

#### **7.3.2.1 Prinzip und Versuchsaufbau**

Die Untersuchung der Kohlenstoffdioxidentwicklung in belüfteten Bioreaktoren erfolgte mit Hilfe eines Respirometers (Degrador, Respirotec, München) mit maximal 16 parallel schaltbaren Reaktoren und rechnergestützter Regelung, Meßwerterfassung und Auswertung (MENNER et al. 1997). Das Prinzip beruht auf der Messung der durch das Prüfgas verursachten Absorption von Infrarotstrahlung durch einen IR-Gasanalysator (Binos 100 2M, Rosemount, Hanau). Die Wahl der Wellenlänge bestimmt die Gasart, die erfaßt wird (in diesem Falle Kohlenstoffdioxid), während die Stärke der Absorption ein Maß für die Konzentration darstellt (ROSEMOUNT 1993). Die Nullpunktkalibrierung erfolgte mit Stickstoff, die Einstellung der Steilheit mit einem 0,04% CO<sub>2</sub>-haltigen Kalibriergas (Linde KG, München).

Das Testsystem verfügt über 16 Meßlinien, so daß Respirationmessungen in insgesamt 15 Bioreaktoren parallel durchführbar sind. Die erste Meßlinie dient als Referenz, um den Kohlenstoffdioxidgehalt der Druckluft zu bestimmen und damit die Meßwerte der restlichen 15 Meßlinien zu korrigieren. In Bild 7.2 ist der schematische Aufbau des Testsystems dargestellt.

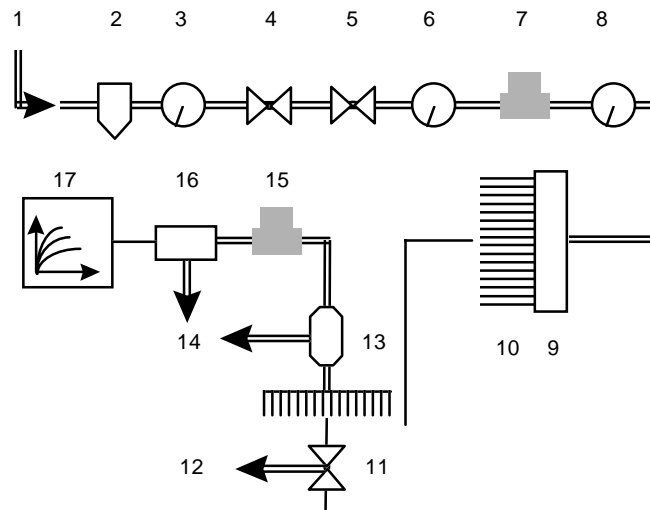


Bild 7.2 Schematischer Aufbau des Testsystems zur on-line-Bestimmung der Kohlenstoffdioxid-entwicklung in Bioreaktoren.

1 Druckluft, 2 Luftfilter, 3 Versorgungsluft-Manometer, 4 Rückschlagventil, 5 Druckregler, 6 Manometer für den Systemdruck vor dem Massenflußcontroller, 7 Massenflußcontroller, 8 Kapillar-Manometer, 9 Luftverteiler zur gleichmäßigen Verteilung der Versorgungsluft auf 16 Meßlinien, 10 16 Kapillaren zur Dämpfung und Erhöhung des Vordruckes, 11 Meßstellenumschalter, 12 Abgas, 13 Peltier-Kühler, 14 Kondensat, 15 thermischer Massenflußmesser, 16 IR-Analysator, 17 Auswertung.

### 7.3.2.2 Durchführung

#### Herstellung der Salze der im BTA-Copolyester vorhandenen Dicarbonsäuren

Terephthalsäure und Adipinsäure sind in Wasser nur in relativ geringen Konzentrationen löslich, und somit für Mikroorganismen nicht ohne weiteres verfügbar. Da bei der Spaltung des BTA-Copolyesters im Mineralsalzmedium oder in der Umwelt mit großer Wahrscheinlichkeit die Salze der Säuren entstehen, wurden diese im Test eingesetzt.

Zur Herstellung der Salze wurden jeweils 10 g der beiden Dicarbonsäuren in 1000-ml-Rundkolben (Weithals) mit jeweils 100 ml deionisiertem Wasser versetzt. Unter Rühren wurde bis zur Neutralisation (pH 7,0) langsam 1 M NaOH hinzugefügt, bis die Dicarbonsäuren vollständig in ihre Salze überführt und somit gelöst waren. Die Salze wurden mittels Rotationsverdampfung abgetrennt und vakuumgetrocknet.

#### Metabolisierung der BTA-Monomere durch eine Kompost-Mischkultur

Es wurden zehn 1000-ml-Reaktoren à 500 ml MSV-Medium 1%ig mit einem Eluat aus frischem Kompost (Kap.7.2.3.1) beimpft. Jeweils drei der Reaktoren enthielten 3g/l 1,4-Butandiol, Na-Adipat oder Na-Terephthalat. Der zehnte Reaktor enthielt als Blindwert das MSV-Medium und das Inokulum, jedoch keine weitere Energiequelle. In den Reaktoren wurde bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 22 Tagen die CO<sub>2</sub>-Entwicklung gemessen.

### Metabolisierung der BTA-Monomere und BTA-Filme durch *T. fusca* DSM 43793

Es wurden dreizehn 1000-ml-Reaktoren mit je 500 ml MSV/Pepton(0,5%)-Medium 1%ig mit in 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) gewaschener Biomasse einer Vorkultur des Stammes *Thermomonospora fusca* DSM 43793 (Kap. 7.2.4) beimpft. Jeweils drei der Reaktoren enthielten 3g/l 1,4-Butandiol, Na-Adipat oder Na-Terephthalat bzw. je 15 BTA-Filme (BTA 40/60, Ø = 2,5 cm, Einwaage: ca. 1 g). Der dreizehnte Reaktor enthielt als Blindwert das MSV/Pepton(0,5%)-Medium und das Inokulum, jedoch keine weitere Energiequelle. In den Reaktoren wurde bei 55°C über einen Zeitraum von 22 Tagen die Kohlenstoffdioxid-entwicklung gemessen.

## 7.4 Biochemische Untersuchungen

### 7.4.1 Herstellung der Puffer

Sofern nicht anders angegeben wurden aus den beiden Pufferkomponenten (Tabelle 7.7) jeweils einzelne Lösungen entsprechender Molarität angesetzt. Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes erfolgte durch Mischung der Lösungen.

Tabelle 7.7 Puffersysteme und ihr Einsatzbereich.

Puffer	pH-Bereich	Molarität	Einsatz
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,1 ± 0,1	80 mM	Waschen von Biomasse zur Vorbereitung von Inokula
	7,0 - 8,5	80 mM	Bestimmung des pH-Optimums für die BTA-Hydrolyse in der Kultur
	7,1 ± 0,1	20 mM	Enzymreinigung (Phenylsepharose) Enzymtests
	5,5 - 8,0	20 und 100 mM	Bestimmung des pH-Optimums der BTA-Hydrolase
	5,0 - 8,0	50 und 100 mM	Test Tube Method
Citronensäure/Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 ± 0,1	20 mM	Enzymreinigung (UNO-S1)
		50 und 100 mM	Test Tube Method
	4,0 - 7,0	150 mM	Bestimmung des pH-Optimums der BTA-Hydrolase
Tris/HCl	9,1 ± 0,1	20 mM	Enzymreinigung (Q-Sepharose FF)
		50 und 100 mM	Test Tube Method
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /NaHCO <sub>3</sub>	9,0 - 11,0	100 mM	Bestimmung des pH-Optimums für die BTA-Hydrolyse in der Kultur



## 7.4.2 Zellaufschluß

### 7.4.2.1 Zerstörung des Actinomycetenmyzels durch Ultraschall

Die nach einer Kultivierung von *Thermomonospora fusca* K13g in TSB-Medium (500 ml, 24 h, 120 Upm) erhaltene Biomasse wurde durch Zentrifugation (Suprafuge 22, Heraeus Holding GmbH, Hannover, 3000 g, 10 min, 4°C) geerntet, in 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) resuspendiert (Gesamtvolumen 15 ml) und mittels einer Ultraschall-Behandlung (pulse: 10 s, Cycle: 50%, Power: MS 73/D, Sonoplus HD 200, Bandelin, Berlin) 5 min bei 4°C aufgeschlossen. Die Zellbruchstücke wurden abzentrifugiert (Suprafuge 22, Heraeus Holding GmbH, Hannover, 8000 g, 20 min, 4°C), in 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) resuspendiert (Gesamtvolumen 20 ml), in Portionen à 3 ml auf 5 kleine Petrischälchen (Ø: 35 mm, Greiner, Frickenhausen) verteilt und mit BTA-Filmen versetzt.

### 7.4.2.2 Zellaufschluß für die Bestimmung intrazellulärer Proteine

Zur Aufnahme von Wachstumskurven wurde der Proteingehalt von Zellen als Biomasseparameter bestimmt. Für die Proteinbestimmung war ein vorgeschalteter Zellaufschluß erforderlich.

In Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde je 1 ml Kultur abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 20800 g, 2 min) und der Überstand verworfen. Das Waschen der Biomasse erfolgte durch dreimaliges Resuspendieren (80 mM Phosphatpuffer, pH 7,1) und Abzentrifugieren (wie oben) der Biomasse. Das Pellet wurde in 1 ml 1 N NaOH resuspendiert und 2 h bei 60°C im Thermomixer inkubiert. Die Zellbruchstücke wurden abzentrifugiert (s.o.) und die Proteine im zellfreien Überstand nach der Methode von LOWRY et al. (1951) quantifiziert (Kap. 7.4.3).

## 7.4.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Zellen und von enzymhaltigen Kulturüberständen wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) durchgeführt. Die Proteingehaltsbestimmung von Proben, die während der Enzymreinigung anfielen, erfolgte mit Hilfe des Micro BCA Tests (Pierce, Rotterdam, Niederlande) nach der Methode von SMITH et al. (1985). Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellung von Kalibriergeraden mit „Bovine Serum Albumin“ (BSA) als Proteinstandard (Konzentrationsbereiche: „Lowry“ 10 - 100 µg/ml, „BCA“ 1 - 20 µg/ml).

Beiden Methoden liegt die Bildung von Kupfer-Protein-Komplexen in alkalischer Lösung zugrunde (Biuret-Reaktion). Diese Komplexe reagieren bei der Methode nach LOWRY et al. (1951) mit Folin-Ciocalteau-Reagenz und bei der Micro-BCA-Methode mit 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA) unter Bildung von Farbkomplexen. Die Intensität der Färbung

verhält sich in beiden Fällen proportional zur Proteinkonzentration und kann photometrisch gemessen werden.

Die Micro-BCA-Methode zeigt nach SMITH et al. (1985) größere Toleranz gegenüber interferierenden Substanzen (insbesondere gegenüber Ammoniumsulfat und Natriumphosphat) sowie eine größere Empfindlichkeit und eignet sich deshalb gut für hochverdünnte Lösungen, weshalb sie zur Proteinbestimmung der Fraktionen während der Reinigung eingesetzt wurde.

#### **7.4.4 Enzymtests**

##### **7.4.4.1 Gewichtsverlust von Polymerfilmen**

###### Macro-Methode

Unter sterilen Bedingungen wurde in 100-ml-Schottflaschen je ein Polymerfilm ( $\varnothing$  2,5 cm) mit 10 ml sterilfiltriertem Kulturüberstand versetzt und eine Woche bei 55°C stehend inkubiert. Die Filme wurden anschließend mit A. deion. und 70%iger wässriger Ethanol-Lösung gewaschen, 24 h bei Raumtemperatur unter Vakuum getrocknet und die Gewichts Differenz auf  $\pm 0,3$  mg ermittelt. Der Gewichtsverlust pro Flächen- und Zeiteinheit wurde als Maß für die Enzymaktivität verwendet.

###### Reagenzglas -Methode

Unter sterilen Bedingungen wurde in sterilen Reagenzgläsern je ein Polymerfilm ( $\varnothing$  0,9 cm) entweder mit 2 ml sterilfiltrierten Kulturüberständen oder mit 50  $\mu$ l gereinigter Enzymlösung (Proteinkonzentration: 500  $\mu$ g/ml) in 1 ml Phosphatpuffer (pH 7,1) versetzt (Dreifachbestimmungen). Die Reagenzgläser wurden 24 h bei 55°C inkubiert. Die weitere Behandlung der Filme erfolgte wie für die Macro-Methode (s.o.) beschrieben.

##### **7.4.4.2 UV-Absorptionstest**

In Quarzglasküvetten wurden 2950  $\mu$ l Puffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1, für Temperaturtests, 150 mM Citratpuffer, 100 mM und 20 mM Phosphatpuffer für pH-Optimum) mit 50  $\mu$ l gereinigter Enzymlösung (Proteinkonzentration: 500  $\mu$ g/ml) versetzt und die Extinktion gegen den Blindwert (BTA-Filme mit Puffer) bei einer Wellenlänge von 242 nm (Absorptionsmaximum der Terephthalsäure) gemessen. Durch Zugabe von vier kleinen BTA-Filmen ( $\varnothing$  0,5 cm) wurde die Reaktion gestartet. Es wurde im Wasserbad temperiert: 55°C für die Bestimmung des pH-Optimums und der Temperaturstabilität, unterschiedliche Temperaturen für die Bestimmung des Temperaturoptimums. Zu unterschiedlichen Zeiten (erste Stunde: alle 15 min, danach halbstündlich) erfolgte nach gutem Durchmischen der

Proben die Messung der Extinktionszunahme mit einem UV-Spectrophotometer (Lambda 15 UV/VIS Spectrophotometer, Perkin Elmer, Überlingen). Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Extinktionszunahme einer Reaktionslösung pro Zeiteinheit wurde als Maß für die Enzymaktivität verwendet.

#### 7.4.4.3 Titration

Lipaseaktivitäten gegenüber unterschiedlichen Substraten wurden mit Hilfe eines Autotitrationssystems (Tabelle 7.15) ermittelt. Das Prinzip beruht auf der kontinuierlichen Neutralisation der durch die Esterspaltungen freiwerdenden Säuregruppen mit Natronlauge und der Aufzeichnung des Volumens an verbrauchter Lauge über den Versuchszeitraum.

Das Reaktionsgefäß bestand aus einem 10-ml-Schnappdeckelglas durch dessen Deckel eine Kanüle für die Zugabe von 0,1 M NaOH, eine weitere Kanüle für die Übersichtung des Ansatzes mit Stickstoff und die pH-Elektrode geführt wurde. Sämtliche Geräte, die mit der Reaktionslösung in Kontakt kamen, wurden durch Spülen mit 70%iger wäßriger Ethanol-Lösung von Fetten befreit. Das Durchmischen der Reaktionslösung erfolgte mit Hilfe eines kleinen Magnetrührkerns, der bei Einsatz von Polymerfilmen durch ein kleines Metallnetz abgedeckt wurde. Ein Temperiermantel (doppelwandiger, offener Glasreaktor mit angeschlossenem Thermostatbad) sorgte für eine konstante Temperatur. Die Titration erfolgte auf einen End-pH von 7,0 mit 0,1 M NaOH, deren Titer zuvor ermittelt wurde.

Als Enzymeinheit (Unit) wurde diejenige Enzymmenge definiert, die 1 µmol Säure in einer Minute unter definierten Bedingungen (Temperatur, pH-Wert) freisetzt.

Die Enzymaktivität ergab sich bei konstantem Verbrauch an Natronlauge aus Gleichung 7.1.

$$EA (U) = \frac{V_P - V_{BW}}{F}$$

Gleichung 7.1

EA:	Enzymaktivität
U:	Unit
V:	Volumen (ml) der pro Minute verbrauchten 0,1 M NaOH
	( <sub>P</sub> ) Probe, ( <sub>BW</sub> ) Blindwert
F:	Umrechnungsfaktor (0,01):
	1 ml 0,1 M NaOH entspricht 100 µmol Esterspaltungen

Die theoretisch möglichen Esterspaltungen ergeben sich aus Gleichung 7.2.

$$ES_{th} = \frac{m}{M_{RE}} \times 2$$

Gleichung 7.2

$ES_{th}$ :	theoretisch vorhandene Estergruppen ( $\mu\text{mol}$ )
$m$ :	eingesetzte Masse des Substrates (g)
$M_{RE}$ :	Molmasse der Repetiereinheit ( $\text{g/mol} \times 10^6$ )
Faktor 2:	Bei der vollständigen Spaltung einer Repetiereinheit werden zwei Säureendgruppen frei.

Aus den durch die Titration ermittelten tatsächlichen Esterspaltungen errechnet sich die prozentuale enzymatische Spaltung nach Gleichung 7.3.

$$ES\% = \frac{ES_{exp}}{ES_{th}} \times 100$$

Gleichung 7.3

$ES\%$ :	gespaltene Estergruppen (%)
$ES_{exp}$ :	tatsächlich gespaltene Estergruppen ( $\mu\text{mol}$ )
$ES_{th}$ :	theoretisch vorhandene Estergruppen ( $\mu\text{mol}$ )

#### BTA-Filme (feste Substrate)

Die Polymerfilme ( $\varnothing = 0,9 \text{ cm}$ ) wurden mit 70%iger wäßriger Ethanol-Lösung (v/v) gespült, Vakuumgetrocknet und gewogen. In einem 10-ml-Schnappdeckelglas wurden in einem Gesamtvolumen von 6 ml sterile NaCl-Lösung (9 g/l, pH 7,0) mit der Enzymprobe vermischt, vortemperiert und der pH-Wert per Hand auf  $7,1 \pm 0,1$  eingestellt. Durch Zugabe von zwei Polymerfilmen wurde die Reaktion gestartet.

#### Triglyceride (flüssige Substrate)

Die getesteten Triglyceride (Tabelle 7.8) lagen bei den Versuchstemperaturen als Öle vor. Da die Lipaseaktivität stark von der Oberfläche des angebotenen Substrates abhängig ist, wurden die Triglyceride zur Aktivitätsbestimmung in wäßrigem Milieu auf eine standardisierte Weise emulgiert.

Emulsionslösung: 4,475 g NaCl, 0,103 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 75 ml destilliertes Wasser und 135 ml Glycerin (99,5%) wurden in einem Becherglas unter Rühren gelöst und anschließend wurde langsam 1,5 g Gummi Arabicum als Emulgator hinzugefügt. Nach vollständiger Auflösung des Emulgators wurde mit destilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Diese Lösung war bei Raumtemperatur einen Monat haltbar.

Zur Herstellung der Substratlösung wurden 0,5 ml der Triglyceride mit 5 ml der Emulsionslösung und 4,5 ml MilliQ-Wasser versetzt. Dieses Gemisch wurde direkt vor dem Beginn des Enzymtestes angesetzt und mit Hilfe eines Ultraturrax 1 min bei 13500 Upm homogenisiert. Die Substratlösung wurde mit der Enzymprobe versetzt (20 µg Enzym je 6 ml Substratlösung), der pH-Wert auf  $7,1 \pm 0,1$  eingestellt und die Titration begonnen.

Tabelle 7.8 Parameter der getesteten Triglyceride.

Triglycerid	Molmasse (g/mol)	Dichte (g/ml)	$\Sigma$ C-Atome (Fettsäuren)
Triacetin	218,2	1,16	C2
Tributyrin	302,37	1,03	C4
Tricaproin	386,53	0,98	C6
Tricaprylin	470,7	0,954	C8
Tricaprin	554,86	(Puder)	C10
Triolein	885,46	0,91	C18

#### 7.4.4.4 Clear Zone Test (CZT)

Zur Beurteilung der Aktivität BTA- und PHB-hydrolysierender Enzyme in Kulturüberständen, sowie zum Screenen von Reinigungsfractionen auf BTA-Enzymaktivität, wurde die Bildung von Aufklarungshöfen auf durch Polymerpartikel getrübbten Agarplatten genutzt.

##### Herstellung von BTA-Agarplatten

Lösung A: 20 g/l Agar in 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,1)

Lösung B: Aus der BTA-Dispersion (BASF) wurde durch Verdünnung mit MilliQ-Wasser, eine BTA-Dispersion (30 g/l) hergestellt. Die verdünnte Dispersion ist autoklavierbar, ohne daß BTA-Partikel agglomerieren.

Beide Lösungen wurden getrennt je 20 min bei 121°C autoklaviert und nach Abkühlung auf ca. 50°C so miteinander vermischt, daß ein BTA-Agar (1,5 g/l) entstand. Um Agarplatten mit möglichst gleichmäßiger Höhe herzustellen, wurden in die Felder dreigeteilter Petrischalen (Ø: 94 mm, Greiner, Frickenhausen) je 4 ml dieser Lösung pipettiert. Nach Gelierung des Mediums wurden mit Hilfe der dicken Enden von Pasteurpipetten je 4 Löcher pro Drittel einer Petrischale zur Aufnahme der Proben ausgestanzt.

##### Herstellung von PHB-Agarplatten

Eine Suspension aus 1,5 g/l P(3HB)-Pulver, 20 g/l Agar und 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) wurde 5 min im Ultraschallbad gemischt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Die

Herstellung gleichmäßig hoher, homogen trüber Agarplatten erfolgte wie für die BTA-Agarplatten (s.o.) beschrieben.

### Durchführung und Auswertung des Clear Zone

#### Tests

In die Vertiefungen der Agarplatten wurden 30 µl der Enzymproben pipettiert und, sofern nicht anders angegeben, 15 ± 2 h bei 55°C inkubiert. Die Ringbreite der Clear Zones wurde mittels Schublehre ausgemessen, damit eine erste grobe Bewertung der Enzymaktivitäten verschiedener Proben vorgenommen werden konnte (Tabelle 7.9).

Tabelle 7.9

Bewertung der Enzymaktivität aufgrund der Ringbreite der gebildeten Clear Zone.

Bewertung	Ringbreite
(+)	< 0,5 mm
+	0,5 - 2,5 mm
++	2,5 - 5 mm
+++	5 - 10 mm
++++	> 10 mm

## 7.4.5 Enzymgewinnung

### 7.4.5.1 Kultur

Als Vorkultur wurden Kulturröhrchen à 5 ml TSB-Medium mit je 200 µl einer Sporensuspension des Stammes *Thermomonospora fusca* DSM 43793 beimpft und 24 h bei 55°C in Schräglage (65-70°) bei 120 Upm inkubiert. Die Hauptkultur erfolgte in mit Alukappen verschlossenen 300-ml-Weithals-Erlenmeierkolben ohne Schikanen, die 80 ml MSV/Pepton(0,5%)-Medium und ca. 100 mg BTA-Copolyester (3 - 4 Filme des BASF-Materials BTA 45/55, Ø = 2,5 cm) enthielten. Die Inkubation wurde nach Beimpfung der Erlenmeierkolben mit je 800 µl der Vorkultur gestartet und erfolgte 18 h bei 55°C und 120 Upm. Durch Zentrifugation (Suprafuge 22, Heraeus Holding GmbH, Hannover, 8000 g, 20 min, 4°C) und anschließende Filtration durch einen groben Papierfilter (595½, Schleicher & Schüll, Dassel) wurde das Medium von der Biomasse getrennt.

### 7.4.5.2 Ammoniumsulfat-Fällung

Die Zugabe von zerriebenem Ammoniumsulfat zum Kulturüberstand erfolgte langsam bei +4°C. Dabei wurde das Salz dem Kulturüberstand unter Rühren in kleinen Mengen so zugegeben, daß es vollständig gelöst war, bevor erneut Salz hinzugegeben wurde. Die Bestimmung der Ammoniumsulfat-Menge zur Einstellung einer gewählten Konzentration (in % der Sättigung) erfolgte mit Hilfe eines Nomogramms nach COOPER (1981, S. 350). Nach Zugabe der gewünschten Menge Ammoniumsulfat wurde die Lösung zur Einstellung des Gleichgewichtes noch 2 h langsam gerührt, bevor das Präzipitat durch Zentrifugation (Suprafuge 22, Heraeus Holding GmbH, Hannover, 44000 g, 30 min, 4°C) gewonnen

wurde. Das Lösen des Pellets erfolgte in dem Puffer, mit dem die nachfolgenden Reinigungsschritte durchgeführt wurden.

#### **7.4.5.3 Ultrafiltration**

Zur Konzentrierung und Umpufferung enzymhaltiger Proben wurde eine Ultrafiltrationszelle (Model 8050, Amicon, Beverly, MA, USA) verwendet. Als Filtermaterialien wurden Ultrafiltrationsmembranen aus regenerierter Cellulose mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa und einem Durchmesser von 47 mm verwendet (UF-Membran RC, Membrapure GmbH, Bodenheim). Die Ultrafiltration erfolgte mit Druckluft bei einem Druck von 3 bar im Kühlraum bei 4°C.

Die Ultrafiltrationsmembranen wurden nach Gebrauch mit 0,1 N NaOH und anschließend mit A. deion. gespült. Die Lagerung erfolgte in 10%iger wäßriger Ethanol-Lösung (v/v) bei 4°C.

#### **7.4.5.4 Dialyse**

##### Lösungen mit Volumina größer als 1 ml

Die Dialyse dieser Lösungen erfolgte über 12 - 24 h bei +4°C in Dialyseschläuchen (Spectra/Por® MWCO: 6000-8000, Ø 2,55 cm, Spectrum Medical Industries, Inc., Laguna Hills, CA, USA), die an beiden Enden mit Klemmen verschlossen wurden. Es wurde im 100fachen Volumen gegen den Zielpuffer equilibriert, wobei der Puffer alle 4 - 8 h gegen frischen Puffer ausgewechselt wurde. Das Ergebnis der Verringerung der Salzkonzentration wurde mittels Leitfähigkeitsmessung (Conductivity Meter LF 318, WTW, Weilheim) überprüft.

##### Lösungen mit Volumina kleiner als 1 ml

Die Dialyse von Lösungen mit einem Volumen kleiner als 1 ml erfolgte ca. 8 h bei +4°C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen. In den Deckel dieser Gefäße wurde ein ca. 7 mm großes Loch gestantzt. Nach Einfüllen der Probe wurde eine Dialysemembran (s.o.) über das offene Reaktionsgefäß gelegt und durch das Verschließen mit dem löchrigen Deckel fixiert. Es wurde im 1000fachen Volumen gegen den Zielpuffer equilibriert, wobei der Puffer alle 2 - 3 h gegen frischen Puffer ausgewechselt wurde.

#### **7.4.5.5 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)**

##### Beschreibung der FPLC-Anlage

Die säulenchromatographischen Methoden wurden mit Hilfe einer Standard-FPLC-Anlage „LCC-500 Plus“ mit automatischer Equilibrierung, Injektion und Elution (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

Nach dem Einbau der gewünschten Säule und der Wahl der Probenaufgabeeinheit wurden die peristaltischen Pumpen der Anlage mit dem Start- und dem Elutionspuffer gespült und befüllt. Die Säule wurde zunächst mit 15 - 20 Säulenvolumina Startpuffer equilibriert bevor die proteinhaltige Probe mittels automatischer Probeninjektion auf die Säule aufgebracht wurde. Der Start des Gradienten erfolgte erst nachdem das nicht bindende Protein eluiert war. Dieses war an einer stabilen Basislinie erkennbar. Mit dem Beginn der Probenauftragung wurden Fraktionen von 0,5 - 0,9 ml gesammelt, die mit Hilfe des Clear Zone Tests (Kap.7.4.4.4) auf BTA-Enzymaktivität getestet wurden.

Die Trennung mittels FPLC erfolgte bei Raumtemperatur (ca. 22°C). Eine anschließende Regeneration der Säulen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### Verwendete Säulenmaterialien

Zur Chromatographie mittels FPLC wurden die in Tabelle 7.10 und Tabelle 7.11 beschriebenen Materialien eingesetzt. Bei der UNO-S1-Säule („Continuous Bed“) und bei den Säulen des HiTrap® HIC Test Kit handelte es sich um vom Hersteller vorgefertigte Säulen. Mit den anderen Materialien wurden selbstgepackte Säulen hergestellt.

Tabelle 7.10 Materialien für die Ionenaustauschchromatographie.

Q-Sepharose Fast Flow	Q 1126	Sigma , Deisenhofen
S-Sepharose Fast Flow	85636	Fluka, Deisenhofen
UNO™-S1	720-0021	BioRad, München

Tabelle 7.11 Materialien für die hydrophobe Interaktionschromatographie.

Sepharose® 4B	84962	Fluka, Deisenhofen
Phenylsepharose CL-4B	17-0810-01	Pharmacia Biotech, Freiburg
HiTrap® HIC Test Kit:	17-1349-01	Pharmacia Biotech, Freiburg
Phenylsepharose High Performance		
Phenylsepharose 6 Fast Flow (low sub)		
Phenylsepharose 6 Fast Flow (high sub)		
Butylsepharose 4 Fast Flow		
Octylsepharose 4 Fast Flow		

#### Puffer- und Probenvorbereitung für die FPLC

Puffer und Proben mußten für den Einsatz in die FPLC filtriert und entgast werden, um sowohl Verstopfungen der Säulen durch Partikel als auch Gasblasen im System, die zu Schwankungen im Durchfluß führen können, zu verhindern.



Die Puffer wurden über regenerierter Cellulose (RC 58 Membranfilter, 0,2 µm, Ø 47 mm, Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert und 30 min unter Rühren im Vakuum an einer Absaugapparatur (1-l-Rundkolben, Membran-Vakuumpumpe und Vakuumcontroller, Vacuubrand, Wertheim) entgast. Die Proteinproben wurden über Sterilfilter (Minisart NML, 0,2 µm, Sartorius, Göttingen) filtriert und bei Volumina kleiner als 10 ml mit Einmalspritzen ohne Kanüle aufgenommen. Die Spritzen wurden mit Parafilm verschlossen, so daß durch weiteres Herausziehen des Kolbens im Inneren der Spritze ein Vakuum entstand und das Gas aus den Proben durch leichtes Schlagen gegen die Spritze ausgetrieben werden konnte. Waren größere Probenvolumina zu entgasen, wurde wie bei den Puffern (s.o.) verfahren, wobei weniger stark gerührt wurde.

#### **7.4.5.6 Test Tube Method**

Zur Optimierung der Bindungsbedingungen in der Säulenchromatographie kam die sogenannte „Test Tube Method“ zum Einsatz, wie sie in einer Broschüre von PHARMACIA (1997a) beschrieben wurde.

Zur Bestimmung des Anfangs-pH-Wertes in der Ionenaustauschchromatographie wurden in jeweils vier Eppendorf-Reaktionsgefäße 150 µl S- bzw. Q-Sepharose (Tabelle 7.10) gegeben. Das Gel in den Gefäßen wurde auf unterschiedliche pH-Werte equilibriert. Dies geschah, indem zehnmal je 1 ml 0,5 M Puffer unterschiedlicher pH-Werte hinzugefügt (Tabelle 7.7), 15 s gemischt und abzentrifugiert wurde (Eppendorf-Zentrifuge, 20800 g, 2 min). Anschließend wurde dieser Vorgang noch fünfmal mit je 1 ml Puffer entsprechender pH-Werte, doch niedrigerer Ionenstärke (0,01 M) wiederholt. In jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde 200 µl einer enzymhaltigen Probe gegeben, gut gemischt und im Thermomixer unter Schütteln 15 min bei 20°C inkubiert. Die Proben waren zuvor gegen die entsprechenden Puffer dialysiert worden.

Nach Abzentrifugieren des Gelmaterials (s.o.) wurde in den Überständen die verbliebene Enzymaktivität mittels Clear Zone Test (Kap.7.4.4.4) bestimmt. Weiterhin wurden auch die Ausgangsproben in den Enzymtest eingesetzt, um ausschließen zu können, daß die eingestellten pH-Werte bereits einen inaktivierenden Einfluß auf die Enzymaktivität ausgeübt hatten.

Die für die hydrophobe Interaktionschromatographie notwendige Salzkonzentration zur Bindung der BTA-Hydrolase an Phenylsepharose CL 4B wurde auf ähnliche Weise getestet. Anstelle unterschiedlicher pH-Werte wurden die Ammoniumsulfat-Konzentrationen in 20 mM Phosphatpuffer variiert (0 M; 0,5 M; 1 M; 1,5 M). Die Salzgehalte der Proben waren entsprechend eingestellt.

## 7.4.6 Elektrophoretische Nachweismethoden

### 7.4.6.1 Analytische SDS-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Proteinreinigungen und zur Bestimmung des Molekulargewichtes des gereinigten Enzyms wurden SDS-Gelelektrophoresen mit ExcelGelen SDS, Gradient 8-18 (Pharmacia Biotech, Freiburg) auf einem Multiphor II Gelelektrophorese-System (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

Die Proben wurden entsprechend den Herstellerangaben (Instructions, 80-1310-00 Edition AE, Pharmacia Biotech, Freiburg) mit „nicht reduzierendem Probenpuffer A“ vorbehandelt. Auf dem Gel liegende Filterplättchen wurden mit je 15 µl Probe (Proteinkonzentration: 5 - 50 µg/ml) getränkt. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 15°C, 600 V, 50 mA und 30 W über 75 min. Die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung mit dem „Silver Staining Kit“ (Code No. 17-1150-01, Pharmacia Biotech, Freiburg) detektiert.

### 7.4.6.2 Isoelektrische Fokussierung

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der gereinigten BTA-Hydrolase erfolgte ebenfalls auf dem Multiphor II Gelelektrophorese-System mit einem „Ampholine® PAGplate“ Gel, pH 3,5 - 9,5 (Pharmacia Biotech, Freiburg).

Es wurden je 10 µl der gereinigten, gegen 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) dialysierten Probe und des pI-Standards (Proteinkonzentrationen: ca. 10 µg/ml) auf Filterplättchen pipettiert, die ca. 1 cm von der Kathode entfernt auf dem Gel lagen. Die Fokussierung erfolgte bei 10°C, 1500 V, 25 mA und 15 W (halbes Gel) über 90 min. Die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung mit dem „Silver Staining Kit“ (Code No. 17-1150-01, Pharmacia Biotech, Freiburg) detektiert.

### 7.4.6.3 Präparative Gelelektrophoresen

Nach der Reinigung der BTA-Hydrolase wurden für den Nachweis der BTA-Enzymaktivität der isolierten Proteinbande sowie für die Aminosäuresequenzierung des gereinigten Enzyms Gelelektrophoresen im präparativen Maßstab durchgeführt.

Es wurden homogene Gele der Größe 7 x 10 cm mit Hilfe des Mini-Protean-II-System von Biorad (München) hergestellt. Die Gelzusammensetzungen und Schichtdicken sind in Tabelle 7.12 und Tabelle 7.13 dargestellt. Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurden den Gellösungen direkt vor dem Gießen zugesetzt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und direkt mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels (ca. 30 min) wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel gegossen und zur Herstellung der Probestaschen ein „Kamm“ in das noch flüssige Sammelgel gesteckt, welches gleichfalls ca. 30 min polymerisierte.

Proben à 40 µl (Proteinkonzentration ca. 200 µg/ml) wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 80 V bis zum Eintritt der Proben in das Trenngel durchgeführt und anschließend wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Der Lauf wurde beendet, sobald die Laufmittelfront das Ende des Gels erreichte.

#### Native PAGE zum Nachweis der Hydrolyseaktivität des gereinigten Enzyms

Probenvorbereitung:

Die für den BTA-Aktivitätsnachweis vorgesehene Probe wurde im Verhältnis 1:2 mit dem Auftragungspuffer versetzt. Zwei Geltaschen wurden mit je 15 µl dieser verdünnten Probe befüllt.

Auftragungspuffer:

62,5 mM Tris, pH 6,8

30% (v/v) Glycerin (100%)

0,25 g/l Bromphenolblau

Laufpuffer:

25 mM Tris, pH 8,6

192 mM Glycin

Der Laufpuffer wurde als 10-fache Stammlösung angesetzt und bei +4°C gelagert.

Tabelle 7.12 Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für die native Gelelektrophorese (Geldicke 0,7 mm).

Lösungen	Sammelgel (5,1%)	Trenngel (8%)
H <sub>2</sub> O	3,2 ml	7,2 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	-	3,8 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml	-
Bis/Acrylamidlösung 300 g/l Acrylamid / 8 g/l N,N-Methylenbisacrylamid	0,5 ml	4 ml
TEMED	15 µl	20 µl
10% APS	60 µl	120 µl

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zwischen den beiden Probenauftragungen mit Hilfe eines Skalpells geteilt. Die erste Hälfte wurde zur Lokalisation der Hauptbande mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe Kap.7.4.6.5). Die zweite Hälfte wurde daraufhin in ca. 2 mm große Abschnitte zerschnitten und diese umgekehrt auf einer BTA-Agarplatte (Kap.7.4.4.4) über Nacht bei 55°C inkubiert, um über die Bildung von Clear Zones die BTA-hydrolysierenden Banden zu ermitteln (Zielprotein).

### SDS-PAGE zur Vorbereitung des Enzyms für die Aminosäuresequenzierung

Probenvorbereitung:

Die für die Aminosäuresequenzierung vorgesehenen Proteinproben wurden im Verhältnis 1:2 mit dem Auftragungspuffer versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt.

Auftragungspuffer:	Laufpuffer:
62,5 mM Tris, pH 6,8	25 mM Tris, pH 8,6
30 g/l (v/v) Glycerin (100%)	192 mM Glycin
60 g/l SDS	1 g/l SDS
15% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol	Der Laufpuffer wurde als 10-fache Stammlösung
0,25 g/l Bromphenolblau	angesetzt und bei +4°C gelagert.

Tabelle 7.13 Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für die SDS-Gelelektrophorese (Geldicke 1 mm).

Lösungen	Sammelgel (5,1%)	Trenngel (15%)
H <sub>2</sub> O	3,2 ml	3,6 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	-	3,8 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml	-
Bis/Acrylamidlösung 300 g/l Acrylamid / 8 g/l N,N-Methylenbisacrylamid	0,5 ml	7,5 ml
100 g/l SDS	50 $\mu$ l	150 $\mu$ l
TEMED	15 $\mu$ l	20 $\mu$ l
100 g/l APS	60 $\mu$ l	120 $\mu$ l

Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingebracht. Noch vor dem Auftragen der Proben wurde für ca. 12 min eine Spannung von 120 V angelegt, um geladene Acrylamid-Reste zu entfernen, die bei der Aminosäuresequenzierung stören könnten.

#### **7.4.6.4 Proteintransfer durch „Western-Blot“**

Die Übertragung von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte nach der Methode des Western Blots. Nach der SDS-Gelelektrophorese sind Proteine negativ geladen und können mit Hilfe eines elektrischen Feldes vom Gel auf eine Membran transferiert werden.

Der Blot wurde in einer Mini Transblot Elektrophoretic Transfer Zelle (Biorad, Richmond, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine auf Gelgröße geschnittene PVDF-Membran (Immobilon-PS Q Transfer Membran, Millipore, Eschborn) wurde zu ihrer Aktivierung

wenige Sekunden mit reinem Methanol befeuchtet. Die PVDF-Membran, das SDS-Gel und die benötigten Fiberpads und Filterpapiere (Blottingpapier GB 004, Schleicher & Schüll, Dassel) wurden etwa 10 min in CAPS-Transferpuffer (s.u.) equilibriert, bevor sie nach Herstellerangaben zwischen zwei Plastikplatten der Blot-Apparatur luftblasen-frei fixiert und in die Mini-Transblot-Zelle eingebracht wurden. Die PVDF-Membran befand sich dabei zwischen Pluspol und Gel, so daß die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld in Richtung Pluspol und damit vom Gel auf die Membran wandern konnten. Der Transfer der Proteine erfolgte 30 min mit 500 mA.

Nach Anfärbung der auf die Membran transferierten Proteine mit Coomassie-Blau (Kap.7.4.6.5) wurden die Proteinbanden mit Hilfe eines Skalpells aus der Membran herausgeschnitten (ca. 31 kDa und 21 kDa), in Plastikröhrchen gegeben, 4 mal 5 min in MilliQ-Wasser gewaschen und zur Aminosäuresequenzierung gegeben.

#### CAPS-Transferpuffer (1 x):

50 mM Tris

39 mM Glycin

0,37 g/l SDS

Der CAPS-Transferpuffer wurde als 10-fache Stammlösung angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

#### **7.4.6.5 Coomassie-Blau-Färbung**

Polyacrylamidgele wurden 1 h in der Färbelösung und 2 h im Entfärber geschwenkt. Die Färbung von PVDF-Membranen erfolgte 1 bis 2 min in der Färbelösung und 1 h im Entfärber.

Färbelösung: 1 g/l Coomassie-Brillantblau in 50% (v/v) wäßrigem Methanol

Entfärber: 100 g/l Essigsäure in 50% (v/v) wäßrigem Methanol

#### **7.4.7 Untersuchung der Aminosäuresequenz**

Für die Aminosäuresequenzierung wurde das BTA-hydrolysierende Enzym von den nach der Reinigung noch vorhandenen Fremdproteinen isoliert. Dies geschah durch Auftrennung der Proteine mittels präparativer SDS-Gelelektrophorese (Kap.7.4.6.3) und Übertragung derselben auf eine PVDF-Membran mit der Methode des Western Blots (Kap.7.4.6.4). Nach Färbung der Proteinbanden wurde die Bande des Enzyms aus der Membran ausgeschnitten und zur Sequenzierung gegeben.

Zur Bestimmung der Gesamtsequenz wurde das Enzym mit Trypsin und GluC verdaut. Die Trennung der entstandenen Peptide erfolgte durch HPLC (reversed phase). Die N-terminale

Sequenz und die Peptidfraktionen aus dem Verdau der BTA-Hydrolase wurden über einen „Edman-Abbau“ in einem „Applied Biosystems 473A Sequencer“ (gas-phase-mode) oder in einem „494A Procise HT Sequencer“ (gas-phase- und pulsed-liquid-mode) mit Standardprogrammen des Herstellers (Applied Biosystems) analysiert.

Durch Sequenzüberlappung und durch Vergleich der Teilsequenzen der BTA-Hydrolase mit den Aminosäuresequenzen zweier bekannter *Streptomyces*-Lipasen wurde die Gesamtsequenz des Enzyms bestimmt. Die Aminosäuresequenzierung wurde von Herrn Dr. M. Kieß (GBF, Braunschweig) durchgeführt.

## 7.5 Chemikalien und Geräte

Sofern nicht in Tabelle 7.14 angegeben, wurden Chemikalien von Merck (Darmstadt), Riedel de Häen (Seelze), Fluka (Deisenhofen), Sigma (Deisenhofen) mit einem Reinheitsgrad >95% verwendet.

In den verschiedenen Versuchen eingesetzte Geräte sind in Tabelle 7.15 aufgelistet.

Tabelle 7.14 Chemikalien.

Chemikalien	Firmen
Bayer Tir 1875	Bayer AG, Leverkusen
Bionolle	Showa Highpolymer, Tokyo, Japan
Bis/Acrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (Cohn-Fraktion V)	Sigma, Deisenhofen
Broad pI Calibration Kit (pH 3-10)	Pharmacia Biotech, Freiburg
BTA 40/60 und BTA 60/40	Hüls AG, Marl
BTA 45:55	BASF, Ludwigshafen
Filme (ZK 1094/13+14) BTA-Dispersion (ZK 458/196/1, 28%)	
Nährmedien	Difco, Augsburg, und Merck, Darmstadt
P(3HB) (Homopolyester)	ICI, Billingham, United Kingdom
<i>Pseudomonas</i> -sp.-Lipase (Katalog-Nr. L 9518)	Sigma, Deisenhofen
SDS-PAGE Standard, Low Range	BioRad, München
SP 3/13	GBF, Braunschweig

Tabelle 7.15 Geräte.

Millipore-Q-Anlage	Millipore, Eschborn
Rotationsverdampfer	Rotavapor R, Büchi Labortechnik, Konstanz
Schüttelinkubator	Infors HT <sup>®</sup> , Bottmingen
Thermomixer	5436, Eppendorf, Hamburg
Titrationsanlage	Titration TTT 60; Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
	PHM 62 Standard pH-Meter; Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
	Autobürette ABU 80; Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
	pH-Elektrode, U 402-M6-S7/100, Ingold, Urdorf/ZH, Schweiz
	Thermostat M3, mgw Lauda, Lauda-Königshofen
	Becker Computer; 286er, 16MHz
Ultraturrax	TP 25, Jahnke & Kunkel KG, IKA-Werk, Staufen i. Breisgau
Universal-Brutschrank	UE 700, Memmert, Schwabach
Vakuumtrockenschrank	VT 5042 EK, Heraeus Holding GmbH, Hannover
Vortex	Vortex Genie 2 <sup>TM</sup> , Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen	Eppendorf-Zentrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg
	Minifuge T, Heraeus Holding GmbH, Hannover
	T6000B, Sorvall GmbH, Bad Homburg
	Suprafuge 22, Heraeus Holding GmbH, Hannover

## 8 Literatur

- AMINABHAVI T.M., BALUNDGI R.H. und CASSIDY P.E. (1990). A review on biodegradable plastics. Polym. Plast. Technol. Eng. 29 (3), 235-262.
- ANDERSSON R.E. (1980). Concentration and partial purification of lipase from *Pseudomonas fluorescens*. Biotechnol. Lett. 2 (5), 247-252.
- ANTONIAN E. (1988). Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. Lipids 23 (12), 1101-1106.
- ARPIGNY J.L., JENDROSSEK D. und JAEGER K.-E. (1998). A novel heat-stable lipolytic enzyme from *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 displaying similarity to polyhydroxyalkanoate depolymerases. FEMS Microbiol. Lett. 167, 69-73.
- AUGUSTA J., MÜLLER R.J. und WIDDECKE H. (1992). Biologisch abbaubare Kunststoffe: Testverfahren und Beurteilungskriterien. Chem. Ing. Tech. 64 (5), 410-415.
- BACHMANN S.L. und MCCARTHY A.J. (1991). Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*. Appl. Environ. Microbiol. 57 (8), 2121-2130.
- BAKER C.J. und BATEMAN D.F. (1978). Cutin degradation by plant pathogenic fungi. Phytopathology 68, 1577-1584.
- BALL A.S. und MCCARTHY A.J. (1989). Production and properties of xylanases from actinomycetes. J. Appl. Bacteriol. 66, 439-444.
- BALL A.S., BETTS W.B. und MCCARTHY A.J. (1989). Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 55 (6), 1642-1644.
- BALL A.S., GODDEN B., HELVENSTEIN P., PENNINGCKX M.J. und MCCARTHY A.J. (1990). Lignocarbhydrate solubilization from straw by actinomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 56 (10), 3017-3022.
- BELLAMY W.D. (1974). Single cell proteins from cellulosic wastes. Biotechnol. Bioeng. 16, 869-880.
- BENEDICT C.V., CAMERON J.A. und SAMUEL, J. (1983). Polycaprolactone degradation by mixed and pure cultures of bacteria and a yeast. J. Appl. Pol. Sci. 28, 335-342.
- BERENS S., KASPARI H. und KLEMME J.-H. (1996). Purification and characterisation of two different xylanases from the thermophilic actinomycete *Microtetraspora flexuosa* SIIIX. Antonie van Leeuwenhoek 69, 235-241.
- BERNIER R., KOPP M., TRAKAS B. und STUTZENBERGER F. (1988). Production of extracellular enzymes by *Thermomonospora curvata* during growth on protein-extracted lucerne fibers. J. Appl. Bacteriol. 65, 411-418.



- BIDLINGMAIER W. (1985). Biologische Grundlagen der Kompostierung, S. 7-21. In: K.J. Thomé-Kozmiensky (ed.), Kompostierung von Abfällen, Band 2, EF-Verlag für Energie und Umwelttechnik GmbH, Berlin.
- BIELY P., MACKENZIE C.R., PULS J. und SCHNEIDER H. (1986). Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Biotechnology* 4, 731-733.
- BONNER M.A. und STUTZENBERGER F.J. (1988). Cell surface changes in *Thermomonospora curvata* during cellulase induction and repression. *Lett. Appl. Microbiol.* 6, 59-63.
- BRADY L., BRZOZOWSKI A.M., DEREWENDA Z.S., DODSON E., DODSON G., TOLLEY S., TURKENBURG J.P., CHRISTIANSEN L., HUGE-JENSEN B., NORSKOV L., THIM L. und MENGE U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343, 767-770.
- BRANDL H., BACHOFEN R., MAYER J. und WINTERMANTEL E. (1995). Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 143-153.
- BROCK T.D. und MADIGAN M.T. (1991). *Biology of microorganisms*. 6th edition. Prentice Hall International, Inc., New Jersey.
- BUSSE H.J., DENNER, E.B.M. und LUBITZ W. (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotechnol.* 47, 3-38.
- CALZA R.E, IRWIN D.C. und WILSON D.B. (1985). Purification and characterization of two  $\beta$ -1,4-endoglucanases from *Thermomonospora fusca*. *Biochemistry* 24, 7797-7804.
- CARLSEN S. (1994). Lipolytic enzymes and their use in the oleochemical and detergent industry. *Fat Sci. Technol.* 96 (11), 408.
- COHORS-FRESENBORG D. (1994). Bedeutung der biologischen Abbaubarkeit für die Bewertung der Umweltgefährdung durch Stoffe, p. 59-61. In: U. Pagga, Biologische Abbaubarbarkeit - Bedeutung für die chemische Industrie. *Bioengineering* 4, 41-63.
- COOPER T.G. (1980). *Biochemische Arbeitsmethoden*. Walter de Gruyter, Berlin.
- CRAWFORD D.L. (1974). Growth of *Thermomonospora fusca* on lignocellulosic pulps of varying lignin content. *Can. J. Microbiol.* 20, 1069-1072.
- CRAWFORD D.L. (1975). Cultural, morphological, and physiological characteristics of *Thermomonospora fusca* (strain 190Th). *Can. J. Microbiol.* 21, 1842-1848.
- CRAWFORD D.L. und SUTHERLAND J.B. (1980). Isolation and characterization of lignocellulose-decomposing actinomycetes, p. 95-101. In: T.K. Kirk, T. Higuchi, H.-M. Chang (ed.), *Lignin biodegradation: microbiology, chemistry, and potential applications*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- CROSS T. (1968). Thermophilic actinomycetes. *J. Appl. Bacteriol.* 31, 36-53.

- CRUZ H., PÉREZ C., WELLINGTON E., CASTRO C. und SERVÍN-GONZÁLEZ L. (1994). Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene* 144, 141-142.
- DESAI A.J. und DHALA S.A. (1969). Purification and properties of proteolytic enzymes from thermophilic actinomycetes. *J. Bacteriol.* 100 (1), 149-155.
- DIN 53749 (1984). Prüfung von Kunststoffen: Einfluß von Pilzen und Bakterien (Visuelle Beurteilung, Änderung der Massen oder der physikalischen Eigenschaften). Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- DIN V 54900-2 (1998). Prüfung der Kompostierbarkeit von Kunststoffen. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- DSMZ-KATALOG (1993). 5. Aufl., Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig.
- EL-NAKEEB M.A. und LECHEVALIER H.A. (1963). Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* 11, 75-77.
- ETTINGER W.F., THUKRAL S.K. und KOLATTUKUDY P.E. (1987). Structure of cutinase gene, cDNA, and the derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi. *Biochemistry* 26, 7883-7892.
- FERGUS C.L. (1964). Thermophilic and thermotolerant molds and actinomycetes of mushroom compost during peak heating. *Mycologia* 56, 267-284.
- FETT W.F., GÉRARD H.C., MOREAU R.A., OSMAN S.F. und JONES L.E. (1992). Cutinase production by *Streptomyces* spp.. *Curr. Microbiol.* 25, 165-171.
- FETT W.F., GÉRARD H.C., JONES L.E., OSMAN S.F. und MOREAU R.A. (1994). Production of cutin-degrading enzymes by plant pathogenic bacteria. *Colloq. INRA*, 66 (Plant Pathogenic Bacteria), 641-646.
- FIELDS R.D. und RODRIGUEZ F. (1976). Microbial degradation of aliphatic polyesters, p.775-784. In: I.M. Sharpley, A.M. Kaplan (ed.), *Proceedings of the 3. Int. Biodegradation Symposium*, EPS Appl. Sci., Barking, England.
- FISCHER B.E. und KLEBER H.-P. (1987). Isolation and characterization of the extracellular lipase of *Acinetobacter calcoaceticus* 69 V. *J. Basic Microbiol.* 27 (8), 427-432.
- FRITZ H.-G., SEIDENSTÜCKER T., BÖLZ U., Juza M., SCHROETER J. und ENDRES H.-J. (1994). Study on production of thermoplastics and fibres based mainly on biological materials. EUR 16102. Directorate-General XII Science, Research and Development.
- GREINER-MAI E., KROPENSTEDT R.M., KORN-WENDISCH F. und KUTZNER H.J. (1987). Morphological and biochemical characterization and emended descriptions of thermophilic actinomycetes species. *Syst. Appl. Microbiol.* 9, 97-109.
- GUSEK T.W. und KINSELLA J.E. (1987). Purification and characterization of the heat-stable serine proteinase from *Thermomonospora fusca* YX. *Biochem. J.* 246, 511-517.

- HEISEY R.M. und PAPADATOS S. (1995). Isolation of microorganisms able to metabolize purified natural rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (8), 3092-3097.
- HENSSEN A. (1957). Beiträge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.* 26: 21-27.
- HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P.H.A., STALEY J.T. und WILLIAMS, S.T. (ed.) (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
- HOLTZ C., KASPARI H. und KLEMME J.H. (1991). Production and properties of xylanases from thermophilic actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek* 59, 1-7.
- HUANG S.J. (1985). Biodegradable Polymers. *Encyclopaedia of Polymer Science and Engineering* 2, 220-241.
- HUANG S.J. (1989). Biodegradation, p. 597-606. In: G. Allen, J.C. Bevington (ed.), *Comprehensive Polymer Science: The Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymers*, vol. 6., Pergamon Press, Oxford.
- IIZUMI T., NAKAMURA K. und FUKASE T. (1990). Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.* 54 (5), 1253-1258.
- JAEGER K.-E., ADRIAN F.-J., MEYER H.E., HANCOCK R.E.W. und WINKLER U.K. (1992). Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* is an amphiphilic protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1120, 315-321.
- JAEGER K.-E., STEINBÜCHEL A. und JENDROSSEK D. (1995). Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly(T-hydroxyalkanoates). *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (8), 3113-3118.
- JEFFRIES T.W. (1994). Biodegradation of lignin and hemicelluloses, p. 233-277. In: C. Ratledge (ed.), *Biochemistry of microbial degradation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- JENDROSSEK D., KNOKE I., HABIBIAN R.B., STEINBÜCHEL A. und SCHLEGEL H.G. (1993). Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of a novel PHB depolymerase from *Comamonas* sp.. *J. Environ. Pol. Deg.* 1 (1), 53-63.
- JENDROSSEK D., BACKHAUS M. und ANDERMANN M. (1995). Characterization of the extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase of *Comamonas* sp. and of its structural gene. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 160-169.
- JENDROSSEK D., FRISSE A., BEHREND S., ANDERMANN M., KRATZIN H.D., STANISLAWSKI T. und SCHLEGEL H.G. (1995). Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system. *J. Bacteriol.* 177 (3), 596-607.

- JENDROSSEK D., SCHIRMER A. und SCHLEGEL H.G. (1996). Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 451-463.
- JENDROSSEK D., TOMASI G. und KROPPESTEDT R.M. (1997). Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol. Lett.* 150, 179-188.
- JOHNSON K.G., HARRISON B.A., SCHNEIDER H., MACKENZIE C.R. und FONTANA J.D. (1987). Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces* spp.. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 403-409.
- KAWAI F. (1995). Breakdown of plastics and polymers by microorganisms. *Adv. Biochem. Eng.* 52, 151-194.
- KAZLAUSKAS R.J. und BORNSCHEUER U.T. (1998). Biotransformations with Lipases, p. 40-191. In: H.-J. Rehm, G. Reed (ed.), in cooperation with A. Pühler, P. Stadler, *Biotechnology: a multi volume comprehensive treatise*, 2nd edition, vol. 8a, Wiley-VCH, Weinheim.
- KEMPF A. und KUTZNER H.J. (1988). Screening von biopolymerabbauenden Exoenzymen bei thermophilen Actinomyceten, S. 979-989. In: VDLUFA-Schriftenreihe 28. Kongressband Teil II. Bonn, Deutschland.
- KIRK T.K. und FARRELL R.L. (1987). Enzymatic „combustion“: the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.
- KLUEPFEL D., SHAREK F., MONDOU F. und MOROSOLI R. (1986). Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 230-234.
- KOBAYASHI H. und RITTMANN B.E. (1982). Microbial removal of hazardous organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 16 (3), 170A-183A.
- KÖLLER W. und PARKER D.M. (1989). Purification and characterization of cutinase from *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 79 (3), 278-283.
- KOLATTUKUDY P.E. (1980). Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208, 990-1000.
- KOLATTUKUDY P.E. (1985). Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 233-250.
- KROPPESTEDT R.M. (1992). The genus *Nocardiopsis*, p. 1139-1156. In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria; Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2<sup>nd</sup> ed., vol. II, Springer-Verlag KG, Berlin.
- KROPPESTEDT R.M. und GOODFELLOW M. (1992). The family Thermomonosporaceae, p. 1086-1114. In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria; Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2<sup>nd</sup> ed., vol. II, Springer-Verlag KG, Berlin.

- KROPFENSTEDT R.M., STACKEBRANDT E. und GOODFELLOW M. (1990). Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. Syst. Appl. Microbiol. 13, 148-160.
- KÜSTER E. und WILLIAMS S.T. (1964). Selection of media for isolation of streptomycetes. Nature (Lond.) 202, 928-929.
- LACEY J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders, p. 231-251. In: G. Sykes und F.A. Skinner, Actinomycetales: characteristics and practical importance, Academic Press, Inc., New York.
- LECHEVALIER H.A. und LECHEVALIER M.P. (1967). Biology of actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol. 21, 71-100.
- LECHEVALIER M.P., DE BIEVRE C. und LECHEVALIER H.A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. Biochem. Syst. Ecol. 5, 249-260.
- LEHNINGER A.L. (1987). Prinzipien der Biochemie. Walter de Gruyter, Berlin.
- LENZ R.W. (1993). Biodegradable polymers. Adv. Polym. Sci. 107, 1-40.
- LIN T.S. und KOLATTUKUDY P.E. (1978). Induction of a biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. J. Bacteriol. 133 (2), 942-951.
- LIN T.S. und KOLATTUKUDY P.E. (1980). Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from phytopathogenic fungi. Physiol. Plant Pathol. 17 (1), 1-15.
- LINOS A. und STEINBÜCHEL A. (1996). Investigations of the microbial breakdown of natural and synthetic rubbers. Dechema Monographs 133, VCH Verlagsgesellschaft, 279-286.
- LIU W.H., BEPPU T. und ARIMA K. (1972). Cultural conditions and some properties of the lipase of *Humicola lanuginosa* S-38. Agr. Biol. Chem. 36 (11), 1919-1924.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. und RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- MAIDAK B.L., OLSEN G.J., LARSEN N., MCCAUGHEY M.J. und WOESE C.R. (1996). The ribosomal database project (RDP). Nucleic Acids Res. 24, 82-85.
- MARTINEZ C., DE GEUS P., LAUWEREYS M., MATTHYSSENS G. und CABBILLAU C. (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. Nature 356, 615-618.
- MARTINEZ C., NICOLAS A., VAN TILBEURGH H., EGLOFF M.-P., CUDREY C., VERGER R. und CABBILLAU C. (1994). Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. Biochemistry 33, 83-89.

- MCCARTHY A.J. (1987). Lignocellulose-degrading actinomycetes. FEMS Microbiol. Rev. 43, 145-163.
- MCCARTHY A.J. und CROSS T. (1984). A taxonomic study of *Thermomonospora* and other monosporic actinomycetes. J. Gen. Microbiol. 130, 5-25.
- MCCARTHY A.J. und WILLIAMS S.T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. Gene 115, 189-192.
- MCCARTHY A.J., BALL A.S. und BACHMANN S.L. (1988). Ecological and biotechnological implications of lignocellulose degradation by actinomycetes, p.283-287. In: Y. Okami, T. Beppu, H. Ogawara (ed.), Biology of actinomycetes '88, Proceedings of seventh international symposium on biology of actinomycetes. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- MCCARTHY A.J., PEACE E. und BRODA P. (1985). Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 238-244.
- MCCARTHY A.J., MASTROMEI G. und PENNINGCKX J.M. (1992). Development of lignocellulose saccharification processes utilizing oxidative and hydrolytic enzymes from actinomycetes. Cellul. Hydrolysis Ferment., 103-109.
- MENNER M., FRANKL M. und LUCK T. (1997). Respirometrische Bioabbau-Untersuchungen. LaborPraxis, Februar 1997, 68-72.
- MERCK (1992). Nährböden Handbuch. E. Merck, Darmstadt
- MERGAERT J. und SWINGS J. (1996). Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. J. Ind. Microbiol. 17, 463-469.
- MERGAERT J., WEBB A., ANDERSON C., WOUTERS A. und SWINGS J. (1993). Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3233-3238.
- MERGAERT J., ANDERSON C., WOUTERS A. und SWINGS J. (1994). Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in compost. J. Environ. Polym. Degrad. 2, 177-183.
- MERGAERT J., WOUTERS A., ANDERSON C. und SWINGS J. (1995). In situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural water. Can. J. Microbiol. 41 (Suppl. 1), 154-159.
- MILLER F. (1992). Vorbild Bananenschale: Verpacken mit abbaubaren Kunststoffen. Der Fraunhofer 3, 22-25.
- MÜLLER B. und JENDROSSEK D. (1993). Purification and properties of poly(3-hydroxyvaleric acid) depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 487-492.
- MUKAI K. und DOI Y. (1995). Microbial degradation of polyesters. Prog. Ind. Microbiol. 32, 189-204.

- MUKAI K., DOI Y., SEMA Y. und TOMITA K. (1993). Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. *Biotech. Lett.* 15 (6), 601-604.
- MURAOKA T., ANDO T. und OKUDA H. (1982). Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. *J. Biochem.* 92, 1933-1939.
- MURPHY C.A., CAMERON J.A., HUANG S.J. und VINOPAL R.T. (1996). *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (2), 456-460.
- NUHN P. (ed.) (1990). *Naturstoffchemie: mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*, S. 218. 2., neu bearb. u. erw. Aufl., Hirzel-Verlag, Stuttgart.
- OECD (1992). *Guidelines for testing of chemicals*. Paris: OECD. ISBN 92-64-12221-4.
- OKEKE C.N. und OKOLO B.N. (1990). The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. *Biotechnol. Lett.* 12 (10), 747-750.
- OMAR I.C., HAYASHI M. und NAGAI S. (1987). Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* no.3. *Agric. Biol. Chem.* 51 (1), 37-45.
- PAGGA U. (1994). Biologische Abbaubarkeit - Bedeutung für die chemische Industrie. *Bioengineering* 4, 41-63.
- PALMISANO A.C. und PETTIGREW C.A. (1992). Biodegradability of plastics. *Bioscience* 42 (9), 680-685.
- PÉREZ C., JUÁREZ K., GARCÍA-CASTELS E., SOBERÓN G. und SERVÍN-GONZÁLES L. (1993). Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. *Gene* 123, 109-114.
- PETERS T. (1992). Vergleich verschiedener Testsysteme zur Untersuchung des biologischen Abbaus von Kunststoffen. Diplomarbeit, GBF, Braunschweig.
- PETROVIĆ S.E., ŠKRINJAR M., BEĆAREVIĆ A., VUJIČIĆ I.F. und BANKA L. (1990). Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechnol. Lett.* 12 (4), 299-304.
- PHARMACIA Handbuch (1997a). Ion exchange chromatography: principles and methods. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.
- PHARMACIA Handbuch (1997b). Hydrophobic interaction chromatography: principles and methods. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.
- PHYTHIAN S.J. (1998). Esterases, p. 194-241. In: H.-J. Rehm, G. Reed (ed.), in cooperation with A. Pühler, P. Stadler, *Biotechnology: a multi volume comprehensive treatise*, 2nd edition, vol. 8a, Wiley-VCH, Weinheim.
- POMMER E.H. (1995). Synthetische organische Materialien, S. 111-150. In: H. Brill (ed.), *Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz. Schädigungsmechanismen und Schutzmaßnahmen*, Gustav Fischer Verlag, Jena.

- PRANAMUDA H., TOKIWA Y. und TANAKA H. (1995). Microbial degradation of an aliphatic polyester with a high melting point, poly(tetramethylene succinate). Appl. Environ. Microbiol. 61 (5), 1828-1832.
- PURDY R.E. und KOLATTUKUDY P.E. (1973). Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. *pisii*: isolation and some properties of the enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 159, 61-69.
- PURDY R.E. und KOLATTUKUDY P.E. (1975). Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isozymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani* f. *pisii*. Biochemistry 14 (13), 2824-2831.
- RAINEY F.A., WARD-RAINEY N., KROPPESTEDT, R.M. und E. STACKEBRANDT (1996). The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 1088-1092.
- ROB A., BALL A.S., TUNCER M. und WILSON M.T. (1995). Isolation and characterization of a novel non-haem extracellular peroxidase produced by the thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. Biochem. Soc. Trans. 23, 507.
- ROSEMOUNT GmbH & Co (1993). Betriebsanleitung: Binos® 100-2M. 3. Ausgabe, Mai 1993
- SAKAI K., HAMADA N. UND WATANABE Y. (1986). Degradation mechanism of poly(vinylalcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and beta-diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp.. Agric. Biol. Chem. 50 (4), 989-996.
- SAOTOME Y., MIYAZAWA T. und ENDO T. (1991). Novel enzymatically degradable polymers comprising  $\alpha$ -amino acid, 1,2-Ethandiol, and adipic acid. Chem. Lett. 1, 21-24.
- SCHIRMER A., MATZ C. und JENDROSSEK D. (1995). Substrate specificities of poly(hydroxyalkanoate)-degrading bacteria and active site studies on the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) depolymerase of *Pseudomonas fluorescens* GK13. Can. J. Microbiol. 41 (Suppl. 1), 170-179.
- SCHLEGEL H.G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl.. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- SCHMIDT-DANNERT C., SZTAJER H., STÖCKLEIN W., MENGE U. und SCHMIDT R.D. (1994). Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. Biochim. Biophys. Acta 1214, 43-53.
- SCOPES R.K. (1987). Protein purification: principles and practice. 2nd edition, Springer-Verlag, New York.
- SEBASTIAN J. und KOLATTUKUDY P.E. (1988). Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere. Arch. Biochem. Biophys. 263 (1), 77-85.



- SMITH P.K., KROHN R.I., HERMANSON G.T., MALLIA A.K., GARTNER F.H., PROVENZANO M.D., FUJIMOTO E.K., GOEKE N.M., OLSON B.J. und KLENK D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchonic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- STELLMACH B., GOTTSCHICK W., BATTERMANN F. und ZABEL K. (ed.) (1988). Bestimmungsmethoden Enzyme - für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin. Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- STUTZENBERGER F.J. (1987). Inducible thermoalkalophilic polygalacturonate lyase from *Thermomonospora fusca*. *J. Bacteriol.* 169 (6), 2774-2780.
- STRYER L. (1990). Biochemie. völlig neu bearb. Aufl.. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg.
- SUGIHARA A., TANI T. und TOMINAGA Y. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp.. *J. Biochem.* 109, 211-216.
- SUGIHARA A., UESHIMA M., SHIMADA Y., TSUNASAWA S. und TOMINAGA Y. (1992). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biochem.* 112, 598-603.
- SUGIURA M. und ISOBE M. (1975). Effects of temperature and state of substrate on the rate of hydrolysis of glycerides by lipases. *Chem. Pharm. Bull.* 23 (3), 681-683.
- SUYAMA T., HOSOYA H. und TOKIWA Y. (1998). Bacterial isolates degrading aliphatic polycarbonates. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 255-261.
- SZTAJER H. und BRYJAK M. (1989). Capillar membranes for purification of *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Bioprocess Engineering* 4, 257-259.
- SZTAJER H. und MALISZEWSKA I. (1989). The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol. Lett.* 11 (12), 895-898.
- TAIPA M.A., AIRES-BARROS M.R. und CABRAL J.M.S. (1992). Purification of lipases. *J. Biotechnol.* 26, 111-142.
- TANSENGCO M.L. und TOKIWA Y. (1998). Thermophilic microbial degradation of polyethylene succinate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 133-138.
- TOKIWA Y. und SUZUKI T. (1978). Hydrolysis of polyesters by *Rhizopus delemar* lipase. *Agric. Biol. Chem.* 42 (5), 1071-1072.
- TRIGO C. und BALL A.S. (1994). Is the solubilized product from the degradation of lignocellulose by actinomycetes a precursor of humic substances? *Microbiology* 140, 3145-3152.
- TSUCHII A., SUZUKI T. und TAKEDA K. (1985). Microbial degradation of natural rubber vulcanizates. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (4), 965-970.

- VALENTINE R.C., SHAPIRO B.M. und STADTMAN E.R. (1968). Regulation of glutamine synthetase; XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. Biochemistry 7, 2143-2152.
- WALLHÄUSSER K.H. (1984). Praxis der Sterilisation - Desinfektion - Konservierung - Keimidentifizierung - Betriebshygiene, Kap. 3.4. 3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- WEBB E.C. (1992). Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the nomenclature committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. Prepared for IUBMB by E. C. Webb. Academic Press, Inc., San Diego.
- WELLINGTON E.M.H. und WILLIAMS S.T. (1978). Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. Microb. Lett. 6, 151-157.
- WESTERHAUSEN J., UTZ H. und BRUNE D. (1990). Untersuchungen zum Einsatz bioabbaubarer Kunststoffe im Verpackungsbereich. BMFT Forschungsbericht Nr: 01-ZV 8904, Dez. 1990.
- WHITAKER A. (1992). Actinomycetes in submerged culture. Appl. Biochem. Biotechnol. 32, 23-35.
- WILSON K. und GOULDING K.H. (1990). Methoden der Biochemie. 3. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart.
- WITT U., MÜLLER R.-J., AUGUSTA J., WIDDECKE H. und DECKWER W.-D. (1994). Synthesis, properties and biodegradability of polyesters based on 1,3-propanediol. Macromol. Chem. Phys. 195, 793-802.
- WITT U., MÜLLER R.-J. und DECKWER W.-D. (1995). New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favorable use properties. J. Environ. Pol. Deg. 3 (4), 215-223.
- WITT U., MÜLLER R.-J. und DECKWER W.-D. (1996). Evaluation of the biodegradability of copolyesters containing aromatic compounds by investigations of model oligomers. J. Environ. Pol. Deg. 4 (1), 9-20.
- WITT U., MÜLLER R.-J. und KLEIN J. (1997). Biologisch abbaubare Polymere: Status und Perspektiven. Franz-Patatz-Zentrum, Braunschweig.
- ZIEMANN-NÖTKE A. (1995). Aufreinigung und Charakterisierung einer extrazellulären Lipase von *Ustilago maydis* ATCC 14826. Dissertation, TU Braunschweig.
- ZIMMERMANN W. (1990). Degradation of lignin by bacteria. J. Bacteriol. 13, 119-130.

## 9 Anhang

Tabelle 9.1 Inkubationstemperaturen und Medien für die Kultivierung sowie für die Untersuchung der BTA-Hydrolyse der Isolate auf Agarplatten

Isolat	Temperatur (°C)		Kultivierungs- medium	BTA-Abbau <sup>b</sup>	
	Bereich <sup>a</sup>	Optimum		Medien <sup>c</sup>	BTA-Abbau
K1a-1 <sup>d</sup>	45 - 65	55	NB	MinB	+
K1a-2 <sup>d</sup>	45 - 65	55	NB	MinB	+
K6a	37 - 65	55	SCK	MinB, MSA, KEA	++
K6b	n.b.	55	SCK	KEA	+++
K6c	n.b.	55	SCK	MinB, KEA	++
K7a-2	45 - 65	55	St-II-Soy	MinB, MSV, KEA	++
K7a-3	37 - 65	55	St-II-Soy	MSV	++++
K7e	n.b.	55	TSB	KEA	+
K7f	45 - 60	55	SCK	alle vier Testmedien	++
K7h	45 - 65	55	SCK	MSV	+++
K9a	37 - 55	45	SCK	MinB, MSA	++
K9b	45 - 55	55	St-II-Soy	alle vier Testmedien	++
K10b	20 - 50	40	St-II-Soy	alle vier Testmedien	++
K11a	37 - 60	55	SCK	alle vier Testmedien	++
K11b	n.b.	55	St-II-Soy	MinB, KEA	+++
K11d	37 - 60	55	St-II-Soy	MSV	+++
K13a	n.b.	55	GYM	KEA	++
K13g	37 - 65	55	St-II-Soy	MSV	++++
K13j	n.b.	55	GYM	MSA, KEA	++
K13k	n.b.	45	GYM	alle vier Testmedien	++
K13l	20 - 50	40	GYM	MSA, CEA	+++

<sup>a</sup> Der Temperaturbereich und das Temperaturoptimum wurden durch makroskopische Beurteilung der Kolonie- und Luftmyzelbildung auf Komplexmedium getestet (TSB-Agar)

<sup>b</sup> In mg Woche<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>: (+) 0,15 - 0,3, (++) 0,3 - 1, (+++) 1 - 2, (++++) > 2.

<sup>c</sup> Medium oder Medien, auf denen das Isolat die besten Hydrolyseleistungen zeigte.

<sup>d</sup> Die Isolate K1a-1 und K1a-2 gehören zur Gattung *Bacillus*. Alle anderen Isolate sind Actinomyceten  
n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 9.2 Auf BTA-Hydrolyse gescreente Stämme der Actinomyceten-Stammsammlung der DSMZ.

## a) Wachstum und BTA-Hydrolyse (DSM-Nr. ....)

40322, 40386, 40395, 43017, 43018, 43113, 43114, 43166, 43176, 43183, 43304, 43350, 43370, 43680, 43683, 43747, 43754, 43755, 43773, 43774, 43785, 43792, 43793, 43795, 43838, 43919-43921, 43938, 43976, 44088, 44091, 44092, 44341

## b) Wachstum, aber keine BTA-Hydrolyse (DSM-Nr. ....)

40001-40019, 40021-40023, 40026-40029, 40032-40053, 40056-40064, 40066-40073, 40077, 40078, 40080-40086, 40088-40095, 40097-40101, 40103, 40104, 40106, 40108-40116, 40122, 40123, 40127-40131, 40133-40139, 40141, 40144-40150, 40152-40155, 40159-40166, 40169, 40172, 40174-40179, 40181, 40183, 40185-40192, 40194-40196, 40198, 40199, 40203, 40206, 40209, 40211-40213, 40216-40223, 40225, 40226, 40228-40234, 40236, 40237, 40243, 40244, 40249, 40250, 40252-40255, 40257-40263, 40265, 40267-40269, 40271-40285, 40292, 40293, 40297, 40300-40304, 40306, 40309, 40310, 40313, 40314, 40316, 40317, 40319, 40323, 40324, 40326, 40327, 40329, 40331, 40332, 40334-40336, 40341, 40346-40348, 40355, 40356, 40358, 40361, 40362, 40366, 40367, 40372, 40383, 40385, 40387, 40392-40394, 40397, 40398, 40412, 40420, 40421, 40429-40431, 40436, 40438, 40443-40445, 40447, 40449, 40452, 40455, 40456, 40459, 40461, 40465, 40467-40470, 40473, 40479, 40480, 40482, 40483, 40486, 40487, 40489, 40492, 40494, 40496, 40499, 40500, 40503-40506, 40512, 40515, 40517, 40526-40528, 40535, 40536, 40539, 40545, 40546, 40551-40555, 40558-40560, 40562-40565, 40568, 40570, 40571, 40573, 40575, 40577, 40578, 40579, 40581, 40586-40588, 40590, 40593, 40595-40599, 40604, 40606, 40635, 40677, 40692, 40741-40743, 40746, 40751, 40754, 40789, 40795, 40799, 40803, 40814, 40815, 40819, 40820, 40823, 40830, 40831, 40833, 40841, 40847, 40894, 40895, 40897-40899, 40905, 40933-40935, 40937, 40938, 40941, 40942, 40945, 41449-41451, 41476, 41614, 41615, 41740, 41741, 41391-41397, 41605, 43001-43011, 43012-43014, 43019-43033, 43035-43037, 43038, 43043, 43045, 43046, 43048, 43049, 43051, 43054, 43056-43112, 43115, 43116, 43118-43120, 43122, 43124-43129, 43131-43137, 43141-43144, 43146-43149, 43151, 43153-43155, 43157-43159, 43161, 43163, 43165, 43168-43174, 43178, 43179, 43181, 43184-43188, 43190-43202, 43204-43224, 43226, 43227, 43229-43235, 43237-43242, 43245-43256, 43258-43265, 43267-43272, 43274-43278, 43280, 43281, 43283-43294, 43296-43303, 43311, 43316, 43334, 43335, 43337-43339, 43341-43347, 43349, 43351, 43353, 43354, 43356-43358, 43360, 43362, 43363, 43367, 43369, 43373, 43376-43383, 43385-43388, 43391-43394, 43397-43402, 43404-43406, 43414-43418, 43420-43427, 43429-43433, 43438-43447, 43449, 43452-43455, 43459, 43461, 43463-43478, 43480-43485, 43490, 43492, 43493, 43495, 43496, 43498, 43499, 43501-43504, 43509, 43513-43516, 43518-43528, 43531-43539, 43543-43547, 43550-43559, 43560, 43562-43575, 43577-43580, 43582-43586, 43588-43592, 43594-43603, 43607, 43610, 43611, 43613, 43617, 43618, 43623, 43625, 43626, 43629, 43632-43635, 43638, 43643-43644, 43646, 43647, 43650-43666, 43668-43670, 43672-43679, 43681, 43682, 43684, 43685, 43687-43694, 43696, 43698-43700, 43702, 43703, 43706-43708, 43710-43718, 43720-43723, 43725-43736, 43739, 43741-43746, 43748, 43750-43753, 43756-43759, 43761, 43764-43769, 43771, 43772, 43775, 43777-43779, 43781, 43782, 43784, 43786, 43787, 43789, 43790, 43794, 43796, 43800-43802, 43804-43806, 43808, 43810, 43812-43815, 43818, 43819, 43823-43826, 43828, 43832, 43833, 43835-43837, 43841, 43843, 43845, 43847-43854, 43856-43858, 43860-43862, 43864-43866, 43868-43871, 43875, 43877, 43884, 43885, 43887-43899, 43901-43907, 43909-43911, 43913-43918, 43925-43933, 43935-43937, 43939-43943, 43945-43961, 43964-43975, 43977-43983, 43985, 43986, 43987, 43991-43997, 43999, 44065, 44069, 44070, 44089, 44090, 44293-44296, 44012, 44080-44083, 44342

Fortsetzung von Tabelle 9.2

c) kein Wachstum (DSM-Nr. ....)

40065, 40105, 40107, 40124, 40125, 40173, 40205, 40242, 40270, 40318, 40340, 40451, 40478, 40481, 40507, 40561, 40594, 40638, 40738, 40824, 40843, 41645, 43015, 43016, 43034, 43039-43042, 43044, 43047, 43050, 43117, 43121, 43123, 43130, 43150, 43152, 43156, 43160, 43162, 43164, 43167, 43175, 43177, 43180, 43225, 43243, 43273, 43308, 43309, 43315, 43336, 43352, 43355, 43359, 43371, 43372, 43374, 43375, 43384, 43428, 43434-43436, 43448, 43450, 43451, 43456-43458, 43462, 43479, 43486-43489, 43494, 43497, 43500, 43505-43508, 43510-43512, 43517, 43529, 43530, 43540-43542, 43548, 43549, 43561, 43576, 43587, 43593, 43604-43606, 43608, 43609, 43621, 43622, 43624, 43627, 43630, 43636, 43637, 43639-43642, 43645, 43648, 43649, 43667, 43671, 43686, 43695, 43697, 43701, 43705, 43709, 43719, 43724, 43737, 43738, 43740, 43749, 43770, 43776, 43780, 43783, 43788, 43791, 43803, 43807, 43816, 43817, 43820-43822, 43827, 43834, 43839, 43840, 43846, 43855, 43859, 43867, 43872, 43876, 43882, 43883, 43886, 43900, 43908, 43912, 43922-43924, 43934, 43944, 43984, 43990, 44261, 44013, 44014, 44084-44087
--